

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE MEDICINA DENTÁRIA



# **Células estaminais do tecido adiposo na Regeneração Óssea**

**Cláudia Sofia Sobral Dias**

MESTRADO INTEGRADO

2012

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE MEDICINA DENTÁRIA



# **Células estaminais do tecido adiposo na Regeneração Óssea**

**Cláudia Sofia Sobral Dias**

**Dissertação orientada pelo Professor Doutor Paulo Valejo Coelho**

**MESTRADO INTEGRADO**

**2012**

*“Eu tenho uma espécie de dever, dever de sonhar, de sonhar sempre,  
pois sendo mais do que um espetáculo de mim mesmo,  
eu tenho que ter o melhor espetáculo que posso.  
E, assim, me construo a ouro e sedas, em salas  
supostas, invento palco, cenário para viver o meu sonho  
entre luzes brandas e músicas invisíveis.”*

*Fernando Pessoa*

*“Querer não é poder. Quem pôde, quis antes de poder só depois de poder. Quem quer  
nunca há-de poder, porque se perde em querer.”*

*Fernando Pessoa*

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente gostaria de agradecer ao Professor Doutor Paulo Valejo Coelho pela disponibilidade e por todo o apoio prestado durante a realização desta dissertação.

Sobretudo, gostaria de expressar a minha enorme gratidão aos meus pais, os meus grandes pilares, sem os quais não poderia ser hoje quem sou. Pelo esforço, pela dedicação, pela educação, pela proteção, pelo carinho e pela disponibilidade a todas as horas.

Agradeço ao meu melhor amigo, o meu irmão, pela partilha de tantos momentos, pelo afeto, pela amizade, por ser quem é.

Um especial agradecimento á minha tia Dulce Sobral, pela contribuição e encorajamento sempre.

Agradeço igualmente aos meus amigos e ao Gonçalo Carvalho, que com a sua motivação e apoio fizeram com que a presente monografia fosse possível.

## ÍNDICE

RESUMO .....	i
ABSTRACT .....	ii
ABREVIATURAS .....	iii
ÍNDICE DE FIGURAS .....	iv
<b>I - Introdução .....</b>	<b>1</b>
<b>II - Células estaminais .....</b>	<b>3</b>
<b>III - Células estaminais do tecido adiposo (ADSCs) .....</b>	<b>6</b>
<b>IV - Colheita de tecido adiposo .....</b>	<b>9</b>
<b>V - Cultura das células estaminais do tecido adiposo .....</b>	<b>10</b>
<b>VI - Fatores de crescimento e osteoindutores .....</b>	<b>15</b>
1 - Mecanismo de ação das proteínas morfogenéticas ósseas (BMPS) .....	16
2 - Genes alvo .....	17
<b>VII - Matrizes Osteocondutoras .....</b>	<b>20</b>
<b>VIII - Discussão .....</b>	<b>22</b>
<b>IX - Conclusão .....</b>	<b>25</b>
<b>X - Bibliografia .....</b>	<b>26</b>

## RESUMO

O tecido ósseo possui uma extensa capacidade de reparação. Contudo, grandes perdas ósseas devidas a lesões traumáticas, ressecções tumorais ou defeitos congênitos exigem o recurso as técnicas de Regeneração Óssea. Apesar das limitações que apresentam, os enxertos ósseos são ainda hoje considerados como “gold standard” na reparação óssea. Como forma de colmatar as limitações destas técnicas, têm sido sugeridas novas terapias baseadas no uso de células estaminais.

A medula óssea tem sido uma das fontes de células estaminais mesenquimatosas mais usadas na Engenharia Tissular Óssea. No entanto, o crescente interesse em torno das investigações e do desenvolvimento das células estaminais tem conduzido á pesquisa de novas fontes.

Em 2002, numa publicação da revista “Molecular Biology of the Cell”, investigadores da UCLA descreveram uma nova população de células estaminais adultas isoladas a partir do tecido adiposo. As células estaminais do tecido adiposo (ADSCs) constituem uma abundante e acessível população de células progenitoras com a capacidade de auto-renovação e de diferenciação em múltiplas linhagens celulares.

Pesquisas in vitro e in vivo em diversas espécies têm demonstrado o grande potencial osteogénico das ADSCs, e a sua contribuição na reparação de defeitos ósseos. O uso destas células combinadas com uma matriz apropriada e fatores de crescimento osteoindutores constituem uma estratégia exequível e promissora para a regeneração óssea guiada.

O objetivo deste trabalho de revisão centra-se na caracterização de uma população de células estaminais que tem depositado grandes esperanças no campo da Medicina Regenerativa e, na apresentação das estratégias correntes da Engenharia Tissular Óssea a partir das ADSCs.

**Palavras-chave:** Células estaminais, Células estaminais do tecido adiposo (ADSCs), Medicina Regenerativa, Regeneração óssea, Engenharia Tissular.

## **ABSTRACT**

Bone tissue has a large healing capability. However, extensive bone loss due to traumatic injury, tumor resection, or congenital defects requires bone regeneration strategies. Presently, bone grafting is the gold standard for bone repair, but presents serious limitations. As a way to overcome such limitations, stem cells application has been suggested as a possible novel therapy.

Bone marrow mesenchymal stem cells (BMDSCs) have been the choice, thus far, for bone Tissue Engineering. Nevertheless, the increased interest surrounding the investigation and development of stem cells has led to search of new cell sources.

In 2002, researchers at UCLA published a manuscript in “Molecular Biology of the Cell” describing a novel adult stem cell population isolated from adipose tissue - the adipose-derived stem cells (ADSCs). Adipose-derived stem cells are an abundant, readily available population of progenitor cells with the capacity to self-renew and the potential for multilineage differentiation.

Recent studies have demonstrated that ADSCs have an extensive osteogenic capacity both in vitro and in vivo in several species, greatly enhancing the healing of bone defects. The use of appropriate scaffolds in combination with ADSCs and suitable growth factors provides a valuable tool for guided bone regeneration.

The goal of this review is to characterize a stem cell population that has been raising great hope in Regenerative Medicine, and present the current strategies of bone tissue engineering with ADSCs.

**Key-words:** Stem cells, Adipose-derived stem cells (ADSCs), Regenerative Medicine, Bone Regeneration, Tissue Engineering.

## **ABREVIATURAS**

ADSCs – Adipose derived stem cells  
BMDSCs – Bone marrow derived stem cells  
DPSC – Dental pulp stem cell  
SHED – Stem cells from human exfoliated deciduous teeth  
PDLSC – Periodontal ligament stem cell  
SCAP – Stem cell of apical papilla  
DFSC – Dental follicle stem cell  
CFU-F – Colony-forming unit-fibroblasts  
VEGF – Vascular endothelial growth factor  
SDF-1 – Stroma cell-derived factor-1  
HGF – Hepatocyte growth factor  
T<sub>3</sub> – Triiodotironina  
DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium  
FGF-2 – Fibroblast growth factor-2  
PDGF – Platelet-derived growth factor  
TAZ – Transcriptional coactivator with PDZ-binding motif  
TGF – Transforming growth factor  
BMP – Bone morphogenetic proteins  
BMP-2 – Bone morphogenetic protein-2  
BMP-7 – Bone morphogenetic protein-7  
OP-1 – Osteogenic protein-1  
MAPK – Mitogen-activated protein kinase  
ERK – Extracellular signal-regulated kinase  
JNK – c-Jun N-terminal kinase  
p38 MAPK – p38 mitogen-activated protein kinase  
Dlx5 – Distal-less homeobox-5  
TCP – Tricalcic phosphate  
HFV – Low amplitude, high frequency vibration  
PLGA – Poly coglycolic Acid copolymer  
MWNTS – Multi-walled carbon nanotubes  
SVF – Stromal vascular fraction  
PSCs – Perivascular stem cells



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Potencial de diferenciação das células estaminais mesenquimatosas na linhagem mesodérmica (Adaptado de <a href="http://stemcellgurus.com/2012/05/08/msc1/">http://stemcellgurus.com/2012/05/08/msc1/</a> ) ..... 5	5
<b>Figura 2:</b> Representação esquemática da obtenção e processamento de ADSCs para implantação: Colheita de tecido adiposo; isolamento das ADSCs; cultura das células em meio proliferativo e de diferenciação; combinação das células com uma matriz condutora; e implantação da estrutura no organismo (Adaptado de Sterodimas <i>et al</i> , 2010)..... 8	8
<b>Figura 3:</b> Representação esquemática da cultura de ADSCs (Adaptado de Cheng <i>et al</i> , 2011)..... 12	12
<b>Figura 4:</b> Micro fotografias de células estaminais derivadas do tecido adiposo de ratos (b); coelhos (c) e porcos (d) fixadas na passagem 6 e coloradas com Hematoxilina-Eosina. Nesta fase todas as células mostravam uma morfologia homogênea fibroblastos-like (Adaptado de Arrigoni <i>et al</i> , 2009) ..... 12	12
<b>Figura 5:</b> Atividade da fosfatase alcalina em células humanas derivadas do tecido adiposo, após 2 (figura da esquerda) e 4 (figura da direita) semanas de cultura em meio osteogénico. Pode ser denotado um aumento da coloração avermelhada, indicativo de maior atividade desta proteína, após 4 semanas de cultura neste meio (Adaptado de Lee <i>et al</i> , 2008)..... 13	13
<b>Figura 6:</b> Expressão da osteocalcina (b e d) e da osteonectina (f e h) por análise de imunofluorescência em células estaminais derivadas do tecido adiposo de coelhos em meio de controlo e em meio de cultura osteogénico (Adaptado de Arrigoni <i>et al</i> , 2009)..... 14	14
<b>Figura 7:</b> Deposição de matriz mineralizada após 28 dias de cultura de ADSCs em meio osteogénico observada através da coloração de Von Kossa (Adaptado de Li <i>et al</i> , 2007)..... 14	14
<b>Figura 8:</b> Representação esquemática dos eventos moleculares envolvidos na diferenciação osteoblástica induzida por BMPs (Adaptado de Ryoo <i>et al</i> , 2006) ..... 17	17

## I - Introdução

O osso é um órgão extremamente ativo no qual ocorrem constantemente processos de remodelação de forma a possibilitar a reparação de pequenas lesões e a garantir a manutenção da sua integridade. Estes processos, são caracterizados pela presença de um equilíbrio complexo entre a reabsorção óssea osteoclástica e a formação óssea osteoblástica. Determinadas condições poderão interferir neste equilíbrio, diminuir a capacidade de cicatrização óssea, ou tornar este processo natural de cura insuficiente. Entre as quais podem ser referidas doenças ou deformações congénitas como a osteogénese imperfeita, traumatismos, fraturas ósseas extensas, infeções, tumores, ressecções tumorais, e tratamentos como a radioterapia (Ryoo *et al*, 2006; Mehta *et al*, 2010; Dimitriou *et al*, 2011).

Considerado tais situações torna-se premente o recurso a técnicas de regeneração óssea. A regeneração consiste na reprodução ou reconstituição dos tecidos perdidos ou danificados, e é o processo biológico pelo qual a arquitetura e a função dos tecidos perdidos são completamente restabelecidas (Hammarstrom, 1997; Esposito *et al*, 2005; Prè *et al*, 2011).

Atualmente os enxertos autógenos são considerados como “gold standard” na reparação cirúrgica de defeitos ósseos combinando as propriedades requeridas num material de enxerto de osteoindutividade, osteocondutividade e células osteoprogenitoras (Ahlmann *et al*, 2002; Al-Salleeh *et al*, 2008; Dimitriou *et al*, 2011;). Tendo como dador o próprio recetor, os enxertos autógenos apresentam-se histocompatíveis e sem rejeição imunológica. A crista ilíaca tem sido mais comumente usada como fonte de enxerto, no entanto, incluem-se nas alternativas a esta o mento, a tibia, a fíbula, o fémur, as costelas e o rádio (Dimitriou *et al*, 2011). Apesar dos bons resultados descritos na literatura relativamente a esta técnica regenerativa, têm sido relatadas algumas complicações, tais como, a morbilidade e dor crónica no local dador, infeção e lesões nervosas e vasculares. Para além disto, esta técnica requer a existência de um segundo local cirúrgico (Ahlmann *et al*, 2002; Hupp *et al*, 2009).

Determinados estudos, têm demonstrado ainda, o sucesso da regeneração óssea utilizando aloenxertos ou xenoenxertos em situações em que o osso autógeno existente é insuficiente. No entanto tais enxertos, sendo derivados de dadores distintos do recetor, da mesma espécie mas geneticamente diferentes ou até de outra espécie,

respetivamente, apresentam ainda a possível rejeição imunológica por parte do hospedeiro, após a implantação e o risco de infecção viral ou bacteriana aumentado (Wang *et al*, 2005, Hupp *et al*, 2009).

Deste modo, como resposta às limitações que se têm vindo a verificar nestas técnicas, estratégias alternativas de regeneração óssea têm emergido com o desenvolvimento e crescente evolução da Engenharia Tissular (Vacanti *et al*, 1999; Al-Salleh *et al*, 2008; Brevi *et al*, 2010; Monaco *et al*, 2011). A sua definição foi proferida por Langer e Vacanti em 1993, como se referindo ao “campo interdisciplinar que aplica os princípios da engenharia e das ciências da vida para o desenvolvimento de substitutos biológicos, com o objetivo de restaurar, manter ou melhorar a função do tecido ou de um órgão inteiro” (Langer *et al*, 1993).

A Engenharia Tissular no campo da regeneração óssea baseia-se na formação de novo osso pela combinação de uma matriz tridimensional osteocondutora, fatores de crescimento osteoindutores e células estaminais osteopotententes (Weinzierl, 2006).

As abordagens atuais para a Engenharia Tissular podem dividir-se em dois tipos: *in vitro*, no qual o tecido alvo é criado num laboratório de cultivo de células, em matrizes biodegradáveis e na presença de determinados fatores antes do seu transplante para o corpo, e *in vivo*, no qual os três elementos são colocados num defeito do tecido *in situ* e, o tecido é restaurado através da maximização da capacidade natural de cura do corpo, criando um ambiente local favorável para a regeneração (Weinzierl, 2006).

Nos últimos anos as células estaminais derivadas de variados tecidos embrionários ou adultos têm afirmado o seu grande potencial em terapias regenerativas, terapias génicas, desenvolvimento de fármacos, e auxiliado na compreensão de variadas doenças.

Através de uma revisão da literatura científica, pretende-se com a presente monografia a tomada de conhecimento acerca da possibilidade do uso de células estaminais derivadas do tecido adiposo (ADSCs) na regeneração óssea, do seu potencial e dos respetivos mecanismos envolventes.

Esta revisão surge de um interesse pessoal na compreensão desta promissora fonte de células no campo da Medicina Regenerativa Óssea e de uma disposição de poder vir a contribuir em investigações futuras nesta área.

## II - Células estaminais

As células estaminais são células indiferenciadas que ao apresentarem a capacidade de auto-renovação e de originar múltiplas linhagens celulares têm vindo a projetar uma grande promessa para a Engenharia Tissular no campo dos procedimentos regenerativos e reconstrutivos (Sterodimas *et al*, 2010; Cheng *et al*, 2011). Estas células possuem a competência de se diferenciarem em pelo menos um tipo celular específico. Tal competência pode ser referida como plasticidade celular e classifica as células estaminais como totipotentes, pluripotentes e multipotentes. As células estaminais totipotentes são capazes de dar origem a todos os tipos de células derivadas das três camadas germinativas: mesoderme, ectoderme, e endoderme, incluindo tecidos embrionários ou extra-embrionários, e só podem ser encontradas num estágio inicial do embrião até oito células. As células estaminais pluripotentes são células capazes de se diferenciar em todos os tecidos do organismo humano, excluindo os tecidos extra-embrionários, e podem ser encontradas na massa celular interna do embrião no estágio de blastocisto. Por sua vez, as células estaminais multipotentes apenas apresentam a capacidade de originar tipos celulares específicos e podem ser encontradas em variados tecidos do organismo adulto (Gomillion *et al*, 2006; Cirne-Lima, 2007; Sterodimas *et al*, 2010).

Para além desta classificação, outra poderá ser utilizada destacando a origem das células estaminais. Estas poderão ser células estaminais de origem no embrião ou no adulto.

Foi em 1975, que os investigadores Martin e Evans obtiveram pela primeira vez células estaminais embrionárias a partir de um teratocarcinoma. Mais tarde, Evans e Kaufman em 1981 vêm a isolar células estaminais a partir da massa interna celular de um embrião de rato em estágio de blastocisto. Só em 1998, Thomson e colaboradores foram capazes de isolar células estaminais a partir de um embrião humano *in vitro*. As células estaminais embrionárias são assim, culturas de células pluripotentes derivadas da massa interna celular do embrião com 3 a 5 dias no estágio de blastocisto (Thomson *et al*, 1998; Bishop *et al*, 2002; Vats *et al*, 2002; Sterodimas *et al*, 2010). Apesar da possível e aliciante aplicabilidade destas células, com grande potencial de diferenciação, para fins terapêuticos e regenerativos, diversas controvérsias éticas, religiosas e políticas têm surgido relativamente ao seu uso (Lee *et al*, 2008; Sterodimas *et al*, 2010). O debate que envolve tais controvérsias tem incluído membros do governo, filiados religiosos,

membros da comunidade científica e representantes da população em geral (Perry, 2000; Kaji *et al*, 2001). Para além disto, associam-se também algumas desvantagens ao uso destas células, tais como a instabilidade genética e o seu maior potencial cancerígeno (Lee *et al*, 2008; Monaco *et al*, 2011).

As células estaminais adultas têm origem em diversos tecidos específicos ou órgãos e podem ser isoladas, cultivadas e expandidas em laboratório. Estas células são consideradas multipotentes e tem como objetivo a manutenção da integridade e a reparação dos tecidos nos quais são encontradas (Turksen, 2004; Cheng *et al*, 2011). Relativamente às células estaminais embrionárias, as células estaminais adultas apresentam algumas vantagens, nomeadamente, a eliminação do risco de rejeição quando o dador e o recetor são o mesmo (Sterodimas *et al*, 2010). As células estaminais adultas, capazes de ser mantidas *in vitro* na forma indiferenciada, são denominadas de células estaminais mesenquimatosas, como é caso das células estaminais derivadas da medula óssea ou do tecido adiposo (Cirne-Lima, 2007).

As células estaminais adultas são consideradas imunoprivilegiadas. Estas, expressam baixos níveis ou até nulos de determinadas moléculas de superfície codificadas pelo complexo maior de histocompatibilidade, dificultando o processo de reconhecimento pelo sistema imunitário, e têm a capacidade de secretar imunomoduladores e fatores com utilidade terapêutica (Le Blanc *et al*, 2003; Meirelles *et al*, 2009; DelaRosa *et al*, 2010; Ghannam *et al*, 2010).

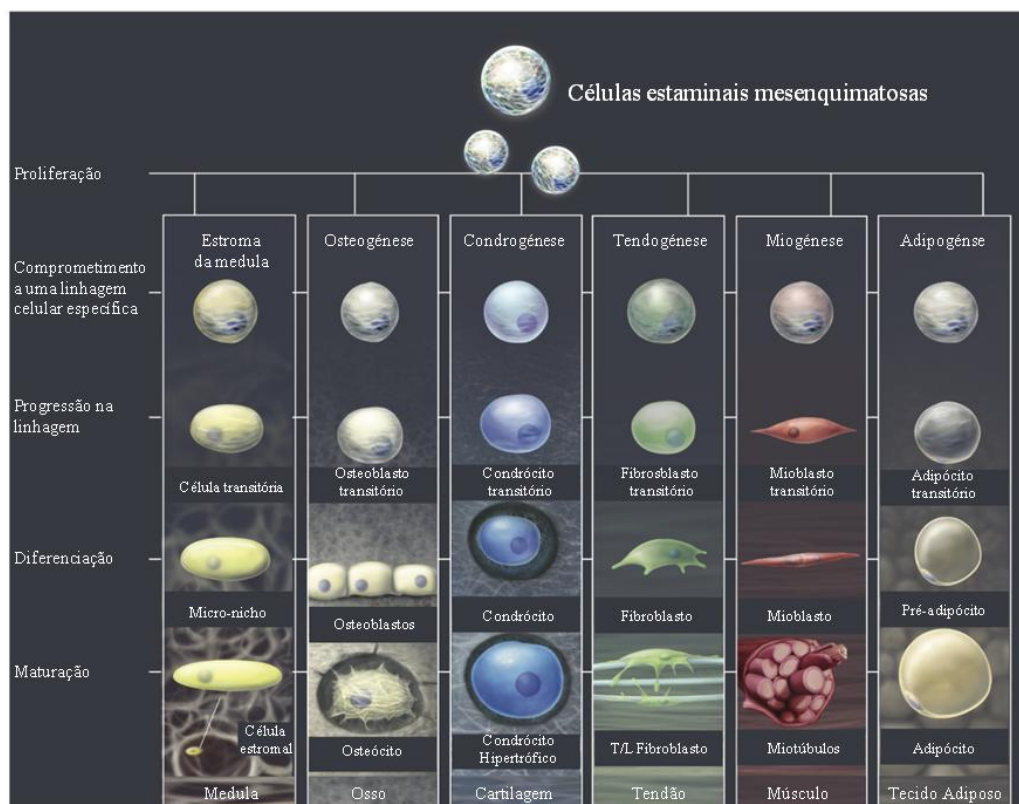
Vários estudos têm demonstrado a presença de células estaminais adultas na medula óssea, no sangue do cordão umbilical, no tecido adiposo, no tecido muscular, no pâncreas, no cérebro, e no sangue (Gomillion *et al*, 2006; Cirne-Lima, 2007; Tsagias *et al*, 2009).

O sucesso do uso de células estaminais a partir do estroma da medula óssea na Engenharia Tissular e no tratamento de doenças, tem estimulado o crescente interesse pelo uso de células estaminais adultas com propósitos terapêuticos do osso (Horwitz *et al*, 2002; Slynarski *et al*, 2006). Células estaminais derivadas da medula óssea foram isoladas a partir da medula óssea de rato há já 20 anos, e esta fonte é considerada, hoje em dia, como a principal de células estaminais mesenquimatosas (Cirne-Lima, 2007).

Dependendo dos sinais estimuladores que recebem as células estaminais adultas podem diferenciar-se em diversos tipos de células especializadas como osteócitos, miócitos, condrócitos, adipócitos, tenócitos e células nervosas (Simsek *et al*, 2012) (Figura 1).

Mais recentemente, outras fontes de células estaminais multipotentes têm sido alvo de investigação. Entre estas destacam-se os tecidos dentários. Primeiramente foram isoladas e caracterizadas células estaminais a partir da polpa dentária e denominadas de “células estaminais da polpa dentária pós-natal” (DPSC). Mais tarde foram identificadas mais quatro fontes de células estaminais derivadas de tecidos dentários: os dentes decíduos exfoliados (SHED), o ligamento periodontal (PDLSC), a papila apical (SCAP), e o folículo dentário (DFSC) (Huang *et al*, 2009; Egusa *et al*, 2012).

Vários critérios devem ser tidos em consideração quando se escolhe uma fonte de células para a regeneração óssea. Acima de tudo, uma escolha terá de ser feita entre células autógenos ou alógenas, entre células diferenciadas da linhagem osteoblástica ou células estaminais indiferenciadas e entre o local de colheita de tais células (Brevi *et al*, 2010; Monaco *et al*, 2011). Por conseguinte, o entendimento da biologia celular e da arquitetura e fisiologia do tecido ósseo são pré-requisitos para a compreensão e aplicação destas células no campo da regeneração óssea.



**Figura 1:** Potencial de diferenciação das células estaminais mesenquimatosas na linhagem mesodérmica. (Adaptado de <http://stemcellgurus.com/2012/05/08/msc1/>).

### III - Células estaminais do tecido adiposo (ADSCs)

Nos últimos anos tem sido largamente documentado e provada a existência de células estaminais adultas multipotentes no tecido adiposo. O tecido adiposo refere-se a um tecido conjuntivo especializado que tem como componente celular essencial os adipócitos com um citoplasma abundante em lípidos. Incluem-se também nos seus componentes celulares os preadipócitos, as células endoteliais, os fibroblastos, os monócitos/macrófagos, os linfócitos e as células do estroma vascular (Albright *et al*, 1998; Lanza *et al*, 2000; Weisberg *et al*, 2003; Xu *et al*, 2003). De uma forma genérica, este tecido tem como principais funções a manutenção da temperatura corporal e o fornecimento de energia ao organismo (Lindsay, 1996).

Segundo diversos autores é da designada fração do estroma vascular que provêm as células estaminais multipotentes deste tecido. Estas têm sido foco de vastas pesquisas científicas com o propósito do seu uso em procedimentos regenerativos e reconstrutivos. O interesse do seu estudo surge como alternativa, e como forma de colmatar limitações e desvantagens de outras fontes de células estaminais adultas atualmente utilizadas, como a medula óssea. (Anurag *et al*, 2007; Sterodimas *et al*, 2010). A simplicidade do procedimento cirúrgico para sua obtenção, a acessibilidade do tecido e a exequibilidade dos procedimentos de isolamento fazem desta uma promissora alternativa á medula óssea (Schaffler *et al*, 2007; Al-Salleeh *et al*, 2008). Pesquisas têm indicado que a produção de ADSC é de aproximadamente de 5000 CFU-F/g de tecido adiposo comparado com aproximadamente 100-1000 CFU-F/ml de medula óssea (Xu *et al*, 2007).

É a capacidade de aderência das ADSCs a materiais plásticos que permite o seu isolamento. Em cultura as ADSCs adquirem uma morfologia fibroblastos-like e têm demonstrado uma impressionante capacidade de auto-renovação, plasticidade e reduzida morbilidade do local dador (Elabd *et al*, 2007; Schaffler *et al*, 2007; Lee *et al*, 2008; Arrigoni *et al*, 2009; Monaco *et al*, 2011). Para além disso, estas células possuem ainda vantagens como a capacidade de proliferação após serem implantadas, a diferenciação em células endoteliais e possível neovascularização, e a secreção de citocinas relacionadas com a angiogénese. Nestas citocinas, incluem-se o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), o fator estimulador de granulócitos/macrófagos, o fator alfa-1 derivado do estroma (SDF-1) e o fator de crescimento hepatócito (HGF) (Suga *et al*, 2008; Shoji *et al*, 2010; Mojallal *et al*, 2011).

Alguns estudos demonstraram que as ADSCs podem melhorar o suprimento vascular após injeção intravenosa ou intramuscular (Cao *et al*, 2005; Kim *et al*, 2007), estimular a subsistência de um enxerto de pele isquêmico por injeção local (Lu *et al*, 2008), e acelerar o processo de cura de uma laceração após administração tópica (Blanton *et al*, 2009; Nambu *et al*, 2007).

Tal como outras fontes de células estaminais adultas já referidas, as ADSCs revelam a sua multipotência possuindo a capacidade de diferenciação em várias linhagens específicas, como adipogénica, condrogénica, miogénica, e osteogénica, quando cultivadas em determinado meio de cultura e estimuladas por fatores de diferenciação específicos (Zuk *et al*, 2002; Gomillion *et al*, 2006; Al-Salleeh *et al*, 2008; Neupane *et al*, 2008).

Estudos revelam que para além da capacidade de diferenciação em tecidos derivados da mesoderme as ADSCs podem originar células nervosas, células endoteliais, hepatócitos e células pancreáticas (Thomson *et al*, 1995; Girolamo *et al*, 2007; Monaco *et al*, 2011).

As ADSCs são descritas por alguns autores como demonstrando semelhanças com as células estaminais derivadas da medula óssea no que diz respeito á sua morfologia e fenótipo. Ambas são consideradas células estaminais mesenquimatosas e partilham vários marcadores de superfície celular, tais como CD13, CD29, CD44, CD90, CD105, SH3, STRO-1 (De Ugarte *et al*, 2003).

Foi proposto, pela Sociedade Internacional para a Terapia Celular (ISCT), em 2006, quatro critérios mínimos para definir as células estaminais mesenquimatosas humanas: (Dominici *et al*, 2006)

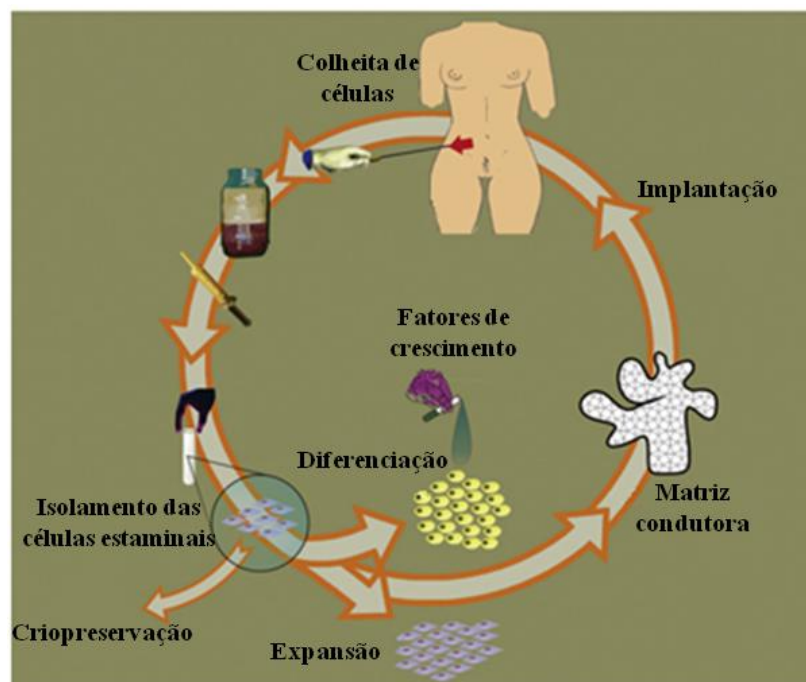
1. Têm de ser plástico-aderentes quando mantidas sob condições standard de cultura.
2. Têm de revelar a habilidade de se diferenciarem em células da linhagem osteogénica, adipogénica e condrogénica.
3. Têm de apresentar a expressão dos marcadores de superfície CD73, CD90, e CD105.
4. Não devem expressar marcadores da linhagem hematopoiética tais como c-kit, CD14, CD11b, CD34, CD45, CD19, CD79 alfa e HLA-DR.

A ausência de expressão de HLA-DR e as propriedades imunossupressivas das ADSCs diminui o risco de rejeição destas células e tornam-nas adequadas para implantação alogénica (Puissant *et al*, 2005; Shaffler *et al*, 2007; Mizuno, 2009).



Segundo Zhang e colaboradores, indivíduos com um índice de massa corporal que indique obesidade, podem apresentar uma maior quantidade de células estaminais mesenquimatosas derivadas do tecido adiposo comparativamente com indivíduos de índice de massa corporal inferior (Zhang *et al*, 2010). Para além disso, estudos indicam que a competência destas células relativamente á sua ativação, expansão e diferenciação pode variar com o local de colheita de tecido, com a idade e com a pratica de exercício físico (Schipper *et al*, 2008; Wahl *et al*, 2008).

Mais recentemente, os resultados do estudo de Mojallal e colaboradores em 2011, demonstraram que a idade e o IMC (índice de massa corporal) não têm influência na concentração e na taxa de crescimento das ADSCs de humanos (Mojallal *et al*, 2011). Em conformidade, na análise de Padoin e colaboradores, também não foi encontrada evidência de que o número de ADSCs fosse afetado pela idade ou pelo IMC (Padoin *et al*, 2008). Igualmente, não existe qualquer correlação entre a deposição de cálcio na matriz óssea formada a partir de ADSCs e a idade do dador de tecido adiposo (Weinzierl *et al*, 2006).



**Figura 2:** Representação esquemática da obtenção e processamento de ADSCs para implantação: colheita de tecido adiposo; isolamento das ADSCs; cultura das células em meio proliferativo e de diferenciação; combinação das células com uma matriz condutora; e implantação da estrutura no organismo (Adaptado de Sterodimas *et al*, 2010).

#### IV - Colheita de tecido adiposo

A quantidade e a acessibilidade de tecido adiposo em humanos têm suportado a viabilidade do uso desta fonte de células mesenquimatosas (Shaffler *et al*, 2007; Monaco *et al*, 2011). Diferentes regiões anatômicas contêm tecido adiposo subcutâneo ou visceral. A região abdominal e interna da coxa foram referenciadas, por Padoin e colaboradores, como contendo uma maior concentração de células após lipoaspiração (Anurag *et al*, 2007; Padoin *et al*, 2008).

Existem controvérsias quanto á influencia da região de colheita de tecido adiposo relativamente ao seu potencial em células mesenquimatosas. Embora alguns autores refiram que tal influência possa estar relacionada com diferenças no que diz respeito a características metabólicas, tais como a atividade lipolítica, a composição em ácidos gordos, e o perfil de expressão genética; outros afirmam que o tecido adiposo subcutâneo e visceral apresentam semelhanças morfológicas, ultraestruturais, fisiológicas e imunofenotípicas, não demonstrando diferenças significativas quanto ao seu potencial celular (Shaffler *et al*, 2007; Baglioni *et al*, 2009).

Os resultados de uma investigação realizada em cães sugerem que a partir do tecido adiposo subcutâneo se obtém um maior número de células mesenquimatosas por grama de tecido comparativamente ao tecido visceral (Neupane *et al*, 2008).

Contrariamente, em relação ao potencial de diferenciação, foi demonstrado que as ADSCs isoladas do tecido adiposo visceral em coelhos possuem um maior potencial osteogénico quando comparadas diretamente com as isoladas do tecido adiposo subcutâneo (Peptan *et al*, 2006).

O tecido adiposo pode ser obtido através de procedimentos como a ressecção cirúrgica, lipoaspiração (lipectomia assistida por sucção), lipoaspiração tumescente, ou lipoaspiração assistida por ultrassons (Gomillion *et al*, 2006; Shaffler *et al*, 2007).

A introdução da lipoaspiração, sendo considerada como um procedimento cirúrgico seguro e a partir do qual é possível obter uma grande número de ADSCs com o mínimo risco, veio simplificar o processo de obtenção de tecido adiposo (Cheng *et al*, 2011). Estima-se que, em todo o mundo, sejam realizadas um milhão de lipoaspirações anualmente. Deste modo, com a crescente popularidade desta técnica na cirurgia estética, foi descrita uma modificação dos métodos de isolamento de células estaminais derivadas do tecido adiposo utilizando tecido obtido por lipoaspiração (Sterodimas *et al*, 2010; Monaco *et al*, 2011).

Na literatura é referido que o potencial proliferativo das células estaminais mesenquimatosas pode estar dependente do procedimento cirúrgico, com algumas vantagens para a ressecção e a lipoaspiração tumescente em relação á lipossucção assistida por ultrassons. Já as características metabólicas e a viabilidade das células parecem não diferir tendo em conta o procedimento (Shaffler *et al*, 2007).

Foi mencionado que o número de ADSC obtidas pode variar dependendo da pressão aplicada durante a colheita (Mojallal *et al*, 2011).

## **V - Cultura das células estaminais do tecido adiposo**

Em 1964, Rodbell, apresentou o primeiro método de isolamento in vitro de adipócitos maduros e células progenitoras de gordura epididimal de rato (Rodbell, 1964).

Em 1977, Van e Roncari, constatarem a existência de células com potencial de proliferação e diferenciação adipogénica em tecido adiposo de ratos adultos (Van *et al*, 1977). Ao longo dos anos, outros métodos de isolamento de ADSCs têm sido descritos, no entanto, muitos laboratórios têm seguido um protocolo padrão descrito inicialmente por Rodbell e Jones.

Após a colheita do tecido adiposo, o mesmo é lavado com uma solução salina tamponada e enviado para o laboratório num meio de crescimento (Li *et al*, 2007; Arrigoni *et al*, 2009; Cheng *et al*, 2011). Dicker, investigou a influência da composição do meio de crescimento na expressão genética das ADSCs e identificou uma expressão distinta em 441 genes dependendo do meio de cultura usado (Dicker *et al*, 2005).

Lin e seus colaboradores, propõem o uso de um meio de crescimento K-NAC (Lin *et al*, 2011). Este, é um meio MCDB 153 modificado suplementado com N-acetilcisteína (NAC) e ácido ascórbico-2-fosfato (Li *et al*, 2007; Neupane *et al*, 2008; Cheng *et al*, 2011).

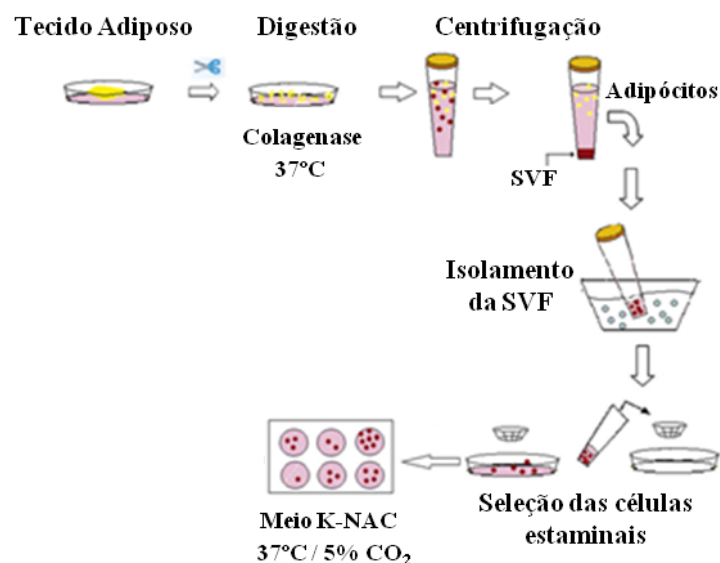
O meio de cultura MCDB 153 é um meio que foi originalmente desenvolvido para a cultura de queratócitos humanos e que contém fator de crescimento epidermal, insulina, hidrocortisona, T3 e extrato pituitário bovino (Boyce *et al*, 1983; Oku *et al*, 1994; Neupane *et al*, 2008). O seu suplemento com antioxidantes NAC e ácido ascórbico-2-fosfato permite aumentar o tempo de vida das células estaminais e o seu potencial de crescimento, podendo as culturas ser mantidas por 20 ou mais passagens sem que as células do estroma percam os seus marcadores de células estaminais

mesenquimatosas. Para além disso, este é um meio com um baixo teor em iões cálcio, que têm sido descritos como indutores e estimulantes da diferenciação das ADSCs. Desta forma, é evitada a diferenciação e prolongado tempo de vida das ADSCs (Cheng *et al*, 2011; Lin *et al*, 2011).

No caso do tecido adiposo obtido por ressecção cirúrgica, no laboratório, usando um bisturi e uma pinça, a amostra de tecido é cortada em pequenos fragmentos e é excluído todo o tecido que não seja tecido adiposo (Schaffler *et al*, 2007, Cheng *et al*, 2011; Mojallal *et al*, 2011). Estes pequenos fragmentos de tecido são depois digeridos numa solução contendo collagenase a 37° C. O tubo é agitado vigorosamente várias vezes, até que a dissociação dos fragmentos de tecido ocorra. A reação de digestão pela collagenase é interrompida adicionando ao meio de crescimento DMEM (Meio de Eagle modificado por Dulbecco), soro fetal de bovino e antibióticos como a penicilina e a estreptomicina. (Neupane *et al*, 2008; Arrigoni *et al*, 2009; Mojallal *et al*, 2011). Posteriormente, procede-se á centrifugação á temperatura ambiente para a separação dos componentes celulares. As frações superiores, contendo adipócitos são removidas, e o sedimento denominado de fração do estroma vascular (SVF), a partir do qual se irão obter as células estaminais multipotentes, é colocado novamente num frasco em meio de crescimento e mantido a 37°C em atmosfera humidificada com 5% de dióxido de carbono (Li *et al*, 2007; Arrigoni *et al*, 2009; Cheng *et al*, 2011).

O último passo consiste na seleção das células com propriedades plástico-aderentes (Monaco *et al*, 2011). Após alguns dias, as células residuais não aderidas são removidas com uma solução salina tamponada e as células aderidas são mantidas para expansão (Arrigoni *et al*, 2009; Cheng *et al*, 2011). Durante todo o período de cultura, o meio de crescimento é substituído cerca de três vezes por semana. Após atingirem uma determinada percentagem de confluência (60% a 90%) as células são incubadas com tripsina para serem destacadas/ dissociadas e são quantificadas (Figura 3). Posteriormente, podem ser colocadas em subcultura ou em criopreservação em nitrogénio líquido para estudos futuros (Neupane *et al*, 2008; Arrigoni *et al*, 2009; Cheng *et al*, 2011).

Rubio e colaboradores, acreditam que, para uso clínico, as ADSCs com pouco tempo de cultura possam ser mais seguras. Tal deve-se á possível transformação maligna destas células quando em cultura prolongada (Rubio *et al*, 2005).



**Figura 3:** Representação esquemática da cultura de ADSCs (Adaptado de Cheng *et al*, 2011).

Os procedimentos de isolamento podem afetar a viabilidade das células e a sua capacidade de diferenciação. Parâmetros como a velocidade de centrifugação e o tipo de colagenase utilizada devem ser tidos em conta. É essencial a caracterização molecular detalhada das células isoladas (Gomillion *et al*, 2006; Shaffler *et al*, 2007).



**Figura 4:** Micro fotografias de células estaminais derivadas do tecido adiposo de ratos (b); coelhos (c) e porcos (d) fixadas na passagem 6 e coloradas com Hematoxilina-Eosina. Nesta fase todas as células mostravam uma morfologia homogênea fibroblastos-like (Adaptado de Arrigoni *et al*, 2009).

A osteogênese pode ser induzida adicionando ao meio de cultura dexametasona, beta-glicerofosfatase, ácido ascórbico-2-fosfato e colecalciferol (vitamina D<sub>3</sub>). As ADSCs são mantidas neste meio durante algumas semanas, e o meio é substituído a cada 2 ou 3 dias (Weinzierl *et al*, 2006; Li *et al*, 2007; Arrigoni *et al*, 2009; Cheng *et al*, 2011).

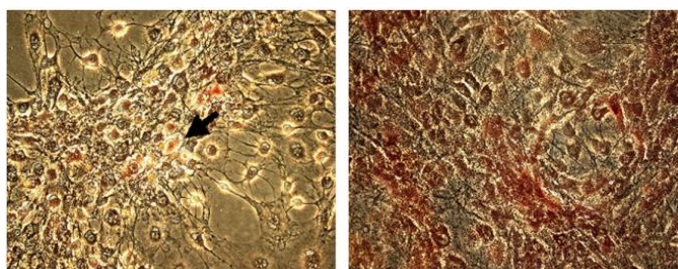
Numa análise realizada *in vitro*, a partir de gordura de rato, é evidenciada a presença de uma matriz mineralizada a partir de ADSCs cultivadas num meio de cultura osteogénico contendo dexametasona, ácido ascórbico-2-fosfato e beta-glicerofosfatase (Al-Salleh *et al*, 2008). Apesar de amplamente usada na cultura de ADSCs, alguns

estudos corroboram o uso da dexametasona na indução de um fenótipo osteogénico nestas células, alegando que esta poderá aliás exercer um efeito inibitório da osteogénese (Zuk *et al*, 2002).

Num estudo de 2008, verificou-se que quando no meio de cultura osteogénico de ADSCs derivadas de cães, era utilizada vitamina D<sub>3</sub> como alternativa á dexametasona a mineralização era mais pronunciada (Neupane *et al*, 2008).

A vitamina D<sub>3</sub> tem um papel fisiológico importante na formação de osso e na sua maturação. A sua importância é demonstrada logo numa fase inicial afetando a proliferação e a diferenciação de primórdios da linhagem osteoblástica e estimulando a expressão de genes relacionados com a formação da matriz e a sua mineralização. O seu papel na maturação óssea relaciona-se com o aumento da concentração de iões cálcio no local de mineralização óssea (Anurag *et al*, 2007). Anurag e os seus colaboradores, afirmam que só pode ser observada a expressão de genes e proteínas associadas com um fenótipo osteoblástico quando as ADSCs são cultivadas com os três suplementos (Vitamina D<sub>3</sub>, b-glicerofosfatase, ácido ascórbico-2-fosfato) (Anurag *et al*, 2007).

O potencial de diferenciação osteogénica das ADSCs pode ser avaliado através de alterações morfológicas, da deposição de matriz extracelular calcificada, da atividade da fosfatase alcalina (Figura 5), da expressão de proteínas específicas do osso (osteonectina, osteocalcina e osteopontina), e da deposição de colagénio tipo I (Weinzierl *et al*, 2006; Arrigoni *et al*, 2009; Jiang *et al*, 2012). As ADSCs, que em cultura teriam uma forma alongada de células fibroblastos-like, adquirem uma forma mais arredondada e cuboidal (Lee *et al*, 2008, Arrigoni *et al*, 2009).

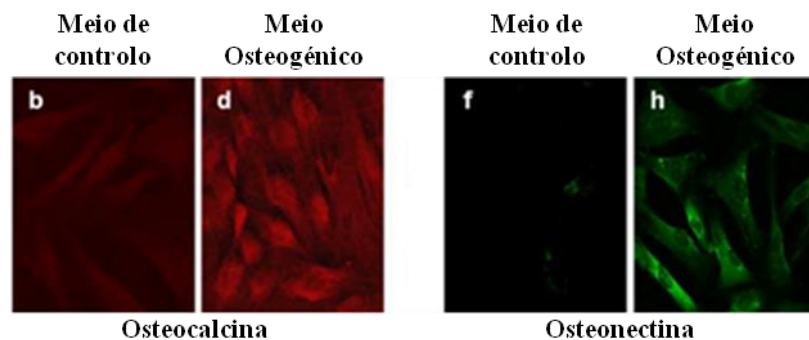


**Figura 5:** Atividade da fosfatase alcalina em células humanas derivadas do tecido adiposo, após 2 (figura da esquerda) e 4 (figura da direita) semanas de cultura em meio osteogénico. Pode ser denotado um aumento da coloração avermelhada, indicativo de maior atividade desta proteína, após 4 semanas de cultura neste meio (Adaptado de Lee *et al*, 2008)

Nos resultados de um estudo de 2009, é evidenciada uma maior atividade da fosfatase alcalina em células derivadas do tecido adiposo de coelhos, cultivadas em

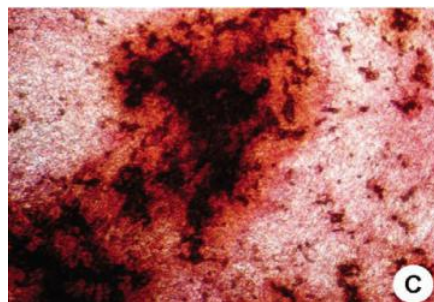
meio osteogénico, comparativamente com células num meio de cultura de controlo. Revelam também, que a atividade desta enzima aumenta de 7 para 14 dias de cultura em meio osteogénico (Arrigoni *et al*, 2009).

In vitro a diferenciação osteoblástica pode ser monitorizada usando os marcadores osteocalcina e osteonectina que são expressados durante o processo de diferenciação e identificados por imunofluorescência (Figura 6) (Weinzierl *et al*, 2006; Arrigoni *et al*, 2009; Cheng *et al*, 2011).



**Figura 6:** Expressão da osteocalcina (b e d) e da osteonectina (f e h) por análise de imunofluorescência em células estaminais derivadas do tecido adiposo de coelhos em meio de controlo e em meio de cultura osteogénico (Adaptado de Arrigoni *et al*, 2009).

No estudo de Cheng e colaboradores, a mineralização pode ser observada colorando as células com “Alizarin Red” (coloração histoquímica para marcadores específicos da linhagem osteogénica) após fixação com formaldeído, já Weinzierl e colaboradores, utilizam a coloração de “Von Kossa” para o mesmo efeito (Figura 7) (Weinzierl *et al*, 2006; Cheng *et al*, 2011).



**Figura 7:** Deposição de matriz mineralizada após 28 dias de cultura de ADSCs em meio osteogénico observada através da coloração de Von Kossa (Adaptado de Li *et al*, 2007).

A primeira fase da diferenciação osteogénica é marcada pela diferenciação e proliferação de osteoblastos e pela formação de uma matriz extracelular incluindo colagénio tipo I. Numa segunda fase a proliferação dos osteoblastos diminui e são

expressos os genes codificantes da osteonectina, da fosfatase alcalina e da osteopontina. Só por fim se dá a mineralização da matriz extracelular e a expressão dos principais genes marcadores de osso, a osteocalcina e a sialoproteína (Lee *et al*, 2008; Jiang *et al* 2012).

## **VI - Fatores de crescimento e osteoindutores**

Os processos de proliferação, alocação e diferenciação terminal numa linhagem celular específica são regulados por mecanismos complexos que envolvem fatores de crescimento, fatores de transcrição das células estaminais, fatores de transcrição celulares específicos e uma grande variedade de cinases celulares e recetores.

Em 2002, Zuk e colaboradores, comprovaram, pela primeira vez, que as ADSCs apresentam uma proliferação e um crescimento estável *in vitro* (Zuk *et al*, 2002). Estas células, podem apresentar uma taxa de proliferação elevada em cultura sem a necessidade de se recorrer a citocinas (Tsagias *et al*, 2009). Ainda assim, a proliferação *in vitro* das células estaminais derivadas do tecido adiposo tem sido demonstrada como aumentando em resposta a determinados fatores de crescimento. Alguns estudos têm indicado que a proliferação destas células pode ser estimulada por fator 2 de crescimento de fibroblasto (FGF-2), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (Mizuno, 2009; Shoji *et al*, 2010).

Antes que o processo de diferenciação possa ocorrer as células estaminais mesenquimatosas têm de estar “alocadas” ou “comprometidas” a uma determinada linhagem celular (Liu *et al*, 2007). Atualmente, os processos que coordenam a alocação inicial á linhagem osteoblástica são ainda pouco compreendidos. Mais estudos são necessários neste campo de forma a que se possam compreender tais mecanismos. TAZ foi identificado como um fator de transcrição inicial com a capacidade de modular a diferenciação mesenquimatosa das células estaminais. TAZ favorece a diferenciação osteogénica através da coativação da transcrição de genes envolvidos na diferenciação osteoblástica (como Runx-2) e da simultânea inibição da transcrição de genes de outras linhagens (Hong *et al*, 2006; Shaffler *et al*, 2007).

Em 1965, foi referido pela primeira vez a existência de agentes indutores de osso na matriz óssea desmineralizada (Urist, 1965). Posteriormente em 1971 Urist e Strates descreveram-nos como sendo agentes proteicos e designaram-nos de proteínas



morfogenéticas ósseas (BMPs) (Urist *et al*, 1971). Em 1988 Wang e colaboradores, ao analisarem as sequências de aminoácidos de vários péptidos destas proteínas, identificou algumas delas como membros da superfamília-beta do fator transformador de crescimento (TGF) (Wang, 1988).

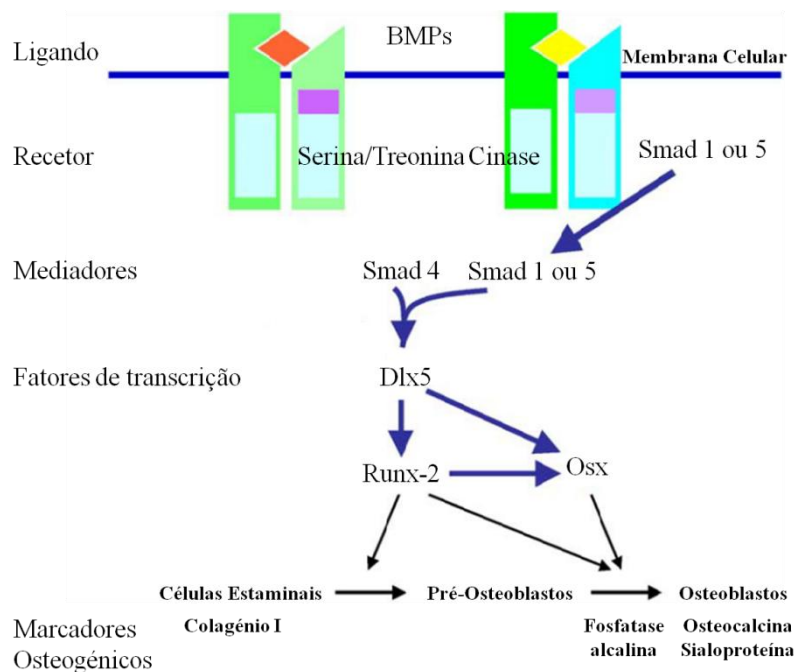
Os fatores osteoindutores conhecidos mais fortes, e os mais amplamente usados são BMP-2 e BMP-7 (ou proteína osteogénica OP-1) (Ryoo *et al*, 2006; Al-Salleeh *et al*, 2008; Davis *et al*, 2011). A ação destas proteínas promove a iniciação e a aceleração do processo de diferenciação das células estaminais mesenquimatosas em osteoblastos (Keibl *et al*, 2011).

### 1 - Mecanismo de ação das proteínas morfogenéticas ósseas (BMPS)

As BMPs exercem os seus diversos efeitos biológicos através de dois tipos de recetores transmembranares: o recetor BMP tipo I (BMPRI) e o recetor BMP tipo II (BMPRII), que possuem uma atividade intrínseca serina/treonina cinase. Um ligando TGF-beta inicia a sinalização através da ligação a um recetor tipo I ou tipo II na superfície celular. Isto permite que haja uma ativação da atividade citoplasmática serina/treonina do recetor, que por sua vez propaga o sinal através da fosforilação de proteínas Smad. As proteínas Smad são transdutores intracelulares das BMPs. Estas, quando ativadas, são translocadas até ao núcleo celular e, em conjunto com outros cofatores nucleares, regulam a transcrição dos genes alvo (Figura 8) (Heldin *et al*, 1997; Shi *et al*, 2003; Ryoo *et al*, 2006).

Para além da via de sinalização das proteínas Smad, outras vias têm sido identificadas como estando envolvidas no processo de diferenciação osteoblástico. A família MAPK refere-se a uma grupo de cinases com atividade serina/treonina que medeiam a resposta celular a diversos estímulos extracelulares. Entre os membros desta família encontram-se: ERK, JNK e p38 MAPK (Ryoo *et al*, 2006; Junttila *et al*, 2008; Gu *et al*, 2011). A ativação numa fase inicial de ERK e subsequente ativação de JNK representam eventos moleculares que desencadeiam a diferenciação osteogénica e bloqueiam a diferenciação adipogénica das células estaminais mesenquimatosas (Liu *et al*, 2009; Gu *et al*, 2011).

Segundo Liu e colaboradores, a ativação de ERK é crucial na regulação da diferenciação osteogénica das ADSCs no humano (Liu *et al*, 2009).



**Figura 8:** Representação esquemática dos eventos moleculares envolvidos na diferenciação osteoblástica induzida por BMPs (Adaptado de Ryoo *et al*, 2006).

## 2 - Genes alvo

Diversos estudos têm demonstrado que os níveis de mRNA de Runx-2 e Osterix são estimulados pelo tratamento com proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs). (Nakashima *et al*, 2002; Davis *et al*, 2011).

Runx-2 tem sido largamente aceite como o fator de transcrição osteogénico principal e estudos confirmam a sua expressão em ADSCs em diferenciação. Este é um membro da família de fatores de transcrição de domínio Runt e o seu gene, no mapa genético humano, localiza-se no cromossoma 6 (6p21) (Ryoo *et al*, 2006; Elabd *et al*, 2007; Tang *et al*, 2011). Runx-2 liga-se a promotores específicos e regula a transcrição de diversos genes cruciais no desenvolvimento osteoblástico. Esta proteína tem uma ação de cooperação com variados fatores e co-fatores de transcrição e, associa-se com a matriz nuclear, para integrar uma variedade de sinais e organizar eventos essenciais durante a diferenciação osteoblástica das células mesenquimatosas multipotentes. A literatura demonstra que Runx-2 tem a capacidade de aumentar a expressão de proteínas major da matriz óssea num estágio inicial da diferenciação osteoblástica, e que a sua expressão deve ser de curta duração, podendo a partir de determinados níveis estimular a reabsorção óssea. Runx-2 desempenha um papel na regulação da produção de vários marcadores ósseos como do colagénio tipo I, da osteocalcina, da osteopontina e da

sialoproteína óssea (Otto *et al*, 1997; Komori *et al*, 2006; Lee *et al*, 2011; Jiang *et al*, 2012).

Osterix (Osx) foi identificado em 2002 por Nakashima e colaboradores como outro fator de transcrição expresso no tecido ósseo em desenvolvimento (Nakashima *et al*, 2002; Tang *et al*, 2011). Osterix é codificado pelo gene Sp7 e regula a expressão de genes em células precursoras de osteoblastos, atuando “downstream” do fator Runx-2 (Otto *et al*, 1997; Nakashima *et al*, 2002; Komori *et al*, 2006). Confirmando este fato, foi concluído que a transfeção de Runx-2 para o interior de células estaminais derivadas do tecido adiposo resultava num aumento significativo da proteína Osx enquanto que, a transfeção de Osx para o interior de ADSCs não resultava num aumento da proteína Runx-2 (Lee *et al*, 2011). Adversamente, outros autores defendem a existência de vias independentes de Runx-2 que modulam a expressão do Osx durante a osteogénese (Celil *et al*, 2005).

Tem sido sugerido que a ação de Runx2 é revelada a partir da etapa de comprometimento á linhagem osteoblástica até ao aparecimento das células osteocondro progenitoras, enquanto Osx atua sobretudo durante a fase terminal da diferenciação osteoblástica (Ryoo *et al*, 2006).

Diversos fatores foram descritos como estando envolvidos durante a aquisição de um fenótipo osteogénico a partir de ADSCs. Dlx5 e ZNF145 são descritos como sendo possíveis reguladores “upstream” de Runx-2 e Osx na via de sinalização das BMPs (Ryoo *et al*, 2006; Liu *et al*, 2007). Acredita-se também, que Tbx3 constitua um fator de transcrição com um papel relevante na diferenciação e proliferação osteogénica em ADSCs humanas (Lee *et al*, 2006). Outros ainda foram identificados, tais como Menin, Shh e Notch-1 (Lian *et al*, 2004; Shaffler *et al*, 2007; Tang *et al*, 2011).

Apesar do já conhecido efeito de BMP-7 (Op-1) na aquisição de um fenótipo osteogénico, até 2008 não se reconhecia a sua ação nas ADSCs. Numa análise *in vitro* realizada em ratos, com esse propósito, constatou-se que a deposição de matriz mineralizada e a secreção de osteopontina é significativamente maior num meio de cultura osteogénico (dexametasona, beta-glicerofosfato e ácido ascórbico-2-fosfato) contendo OP-1. Curiosamente, constatou-se de igual forma a deposição de uma maior quantidade de matriz mineralizada num meio de cultura contendo apenas OP-1, sem o meio osteogénico convencional. Tal facto, indicam os autores, pode estar relacionado com um efeito controverso dos nutrientes utilizados no meio osteogénico, possivelmente da dexametasona, que poderá neste caso exercer um efeito inibitório de

OP-1. Pensa-se que o uso de diferentes concentrações de OP-1 poderá induzir a diferenciação das ADSCs em diferentes linhagens e que a concentração de 250 ng/mL parece ser apropriada para estimular a osteogênese nestas células (Al-Salleeh *et al*, 2008).

Como resposta a alguns estudos indicando a fraca potencialidade das ADSCs na reparação de grandes defeitos ósseos, surge um estudo no qual ADSCs de coelho são tratadas com um baculovírus modificado. Este baculovírus modificado tem como objetivo prolongar a expressão de BMP-2/VEGF, estimulando a osteogênese e a angiogênese, após alotransplante em defeitos ósseos extensos. Parece que desta forma pode haver uma melhoria no metabolismo ósseo, no volume ósseo, na densidade óssea, e nas propriedades mecânicas do osso (Lin *et al*, 2011). Já em 2007 tinha sido comprovado que ADSCs de cães infetados por um adenovírus transportador do gene que codifica BMP-2 numa matriz de TCP (beta-fosfato tricálcico) pode aumentar a reparação de grandes defeitos ósseos, com a degradação do biomaterial e a formação de osso cortical no defeito (Li *et al*, 2007).

Outra limitação que se tem revelado nos procedimentos convencionais de regeneração óssea a partir de ADSCs é a dificuldade de manutenção *in vivo* do meio osteogénico utilizado na cultura *in vitro* destas células. A manutenção do fenótipo osteogénico *in vivo* das ADSCs aderidas a uma matriz constitui um dos pontos chave para o sucesso da regeneração óssea (Gu *et al*, 2011). Alguns estudos focam a possibilidade do uso da terapia génica para colmatar tal limitação. Refutando o recurso a métodos de transfecção virais, pela possível reação imunológica, Lee, na sua investigação recorre á transfecção de Runx-2 e Osterix através de eletroporação para estimular o potencial osteogénico das ADSCs na regeneração óssea *in vitro* e *in vivo*. Nos seus resultados concluiu que a expressão genética de marcadores osteogénicos (fosfatase alcalina, osteocalcina, colagénio tipo I, sialoproteína óssea) aumentou com a expressão induzida de Runx-2 e Osterix. Os resultados mostraram-se mais favoráveis com o recurso a Runx-2 uma vez que este atua “upstream” de Osterix (Lee *et al*, 2011; Lin *et al*, 2011).

Nos últimos anos, têm sido sugerido o recurso a ultrassons de baixa intensidade para estimular a diferenciação das células estaminais mesenquimatosas do tecido adiposo, através do aumento da produção de determinados fatores de transcrição ósseos e da expressão de genes marcadores ósseos (Jiang *et al*, 2012).

Pode ser afirmado também, que o tratamento de ADSCs com HFV (vibração de alta frequência e baixa amplitude) durante a cultura, pode ser eficaz na aceleração do processo de diferenciação em osteoblastos (Prè *et al*, 2011).

## VII - Matrizes Osteocondutoras

O “ambiente” tridimensional utilizado na regeneração a partir de células estaminais será crítico para o sucesso da diferenciação osteogénica (Shaffler *et al*, 2007).

Posteriormente á colheita e á cultura apropriada, as células estaminais são colocadas numa matriz que irá suportar a colonização, a migração, o crescimento e a diferenciação celular. Na Engenharia Tissular Óssea in vivo, o conjunto de células, matriz osteocondutora e fatores osteoindutores é implantado no local afetado (Al-Salleh *et al*, 2008; Monaco *et al*, 2011).

A matriz ideal deve sustentar nova formação óssea e, uma vez cumpridas as suas funções, permitir a sua própria degradação. Por conseguinte, as matrizes atuam como estruturas de suporte, providenciando uma superfície para a aderência das células, guiando o desenvolvimento de novo tecido e permitindo a mimetização da forma tridimensional do tecido (Gomillion,*et al*, 2006).

A composição química, a estabilidade mecânica, e a arquitetura tridimensional do biomaterial da matriz constituem fatores que devem ser considerados, de forma a que possa ser garantida uma penetração celular adequada e um grau de proliferação e diferenciação celular apropriados após implantação (Gomillion *et al*, 2006; Sterodimas *et al*, 2010).

Pretende-se que uma matriz tenha as seguintes características: 1) integridade mecânica; 2) adequada bioatividade (osteocondutividade e osteoindutividade); 3) biodegradação previsível; 4) não toxica; 5) boa plasticidade; 6) possibilidade de ser esterilizada sem comprometimento da sua bioatividade; e 7) arquitetura porosa (Porter *et al*, 2009; Gu *et al*, 2011).

Alterações na porosidade e no tamanho dos poros de uma matriz conduzem a alterações na ligação dos fatores de crescimento, na resposta da célula ás BMPs e no transporte de nutrientes (Lee *et al*, 2008; Davis *et al*, 2011).

Com base nestas propriedades vários biomateriais têm sido sugeridos e analisados. As matrizes de aglomerado de partículas de quitosano, de fibrina e de beta

fosfato tricálcico foram descritas como sendo adequadas para a Engenharia Tissular osteocondral de ADSCs (Malafaya *et al*, 2005; Leong *et al*, 2008; Okuda *et al*, 2010; Keibl *et al*, 2011). A fibrina, sendo um biomaterial que promove a cicatrização e que mostra excelentes características de adesividade celular poderá ser uma promissora matriz para as ADSCs e BMP-2 (Keibl *et al*, 2011).

Analogamente, o colagénio, a hidroxiapatite e o *poli* (ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) parecem ser materiais úteis na regeneração óssea a partir de ADSCs (Weinzierl *et al*, 2006; Lee *et al*, 2008; Arrigoni *et al*, 2009; Davis *et al*, 2011; Lee *et al*, 2011). Numa investigação realizada em porcos e coelhos comprovou-se que as ADSCs podem colonizar uma matriz porosa de hidroxiapatite e nesta, proliferar e diferenciarem-se em osteoblastos (Arrigoni *et al*, 2009).

Usando ADSCs de humanos em matrizes de PLGA, concluiu-se que após 4 semanas de diferenciação osteogénica, os poros da matriz se encontravam integralmente preenchidos por células em proliferação (Lee *et al*, 2008).

De modo alternativo, na literatura, são descritas algumas modificações a que as matrizes sintéticas podem ser sujeitas de forma a aumentar a sua osteocondutividade, e mantendo a sua biodegradabilidade. Davis e colaboradores, concluíram que o revestimento de uma matriz de PLGA com apatite carbonada permite uma maior absorção de BMPs, uma maior secreção de cálcio e uma maior atividade da fosfatase alcalina, comparativamente á mesma matriz sem o tratamento com este biomineral (Davis *et al*, 2011).

Embora o impacto das matrizes tridimensionais osteocondutoras em associação com sinais solúveis na diferenciação de células progenitoras não seja ainda bem claro, alguns investigadores acreditam que os materiais poliméricos oferecem um melhor controlo relativamente às taxas de libertação de proteínas osteoindutoras (BMPs), quando comparados com as esponjas de colagénio, que têm sido geralmente usadas para este efeito (Liu *et al*, 2007; Kang *et al*, 2008; Autefage *et al*, 2009; Keibl *et al*, 2011).

Recentemente, surgiu uma investigação *in vitro* e *in vivo* indicando que nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWNTs), um material condutor com diversas aplicações hoje em dia, podem estimular a formação de osso ectópico a partir de ADSCs. Este material não requer o recurso a fatores de crescimento exógenos ou a revestimentos (Li *et al*, 2012).

## VIII - Discussão

O crescente interesse pelas células estaminais aliado aos recentes progressos da Bioengenharia tem tornado estas células como uma viável e extraordinária alternativa a diversas terapias habitualmente utilizadas (Mizuno, 2009). Graças a estas, a regeneração de alguns tecidos ou órgãos é hoje possível. Investigações decorrem para que num futuro as células estaminais possam ser usadas para o tratamento de patologias como o cancro, a diabetes, doenças auto-imunes, perturbações neurológicas, doença de Parkinson, entre muitas outras (Bragança *et al*, 2010).

Com as controvérsias éticas e religiosas em torno do uso das células estaminais embrionárias, o mundo científico foca-se hoje na busca de alternativas. As células estaminais adultas multipotentes têm feito jus aos recursos despendidos no seu estudo nos últimos anos, tendo-se tornado numa grande promessa na Medicina Regenerativa (Arrigoni *et al*, 2009; Mizuno *et al*, 2009).

Mais ou menos pesquisadas, a medula óssea, o tecido muscular, a pele, o fígado, os tecidos dentários, os folículos do cabelo, o pâncreas, o cérebro, o sangue do cordão umbilical, e o líquido amniótico parecem constituir fontes de células estaminais pós-natais, já isoladas e passíveis de serem manipuladas em laboratório (Gomillion *et al*, 2006; Cirne-Lima, 2007; Tsagias *et al*, 2009; Zuk, 2010).

Em 2002, uma equipa da UCLA teve o privilégio de acrescentar mais uma fonte viável de células estaminais ao vasto leque de fontes identificadas, caracterizando uma nova população de células estaminais mesenquimatosas multipotentes, as derivadas do tecido adiposo. Foi nesta publicação que pela primeira vez se demonstrou a capacidade de proliferação e diferenciação destas células (Zuk *et al*, 2002). A partir daí uma nova época se iniciou no imenso mundo da Engenharia Tissular e, pelas potenciais vantagens destas células, muitos investigadores apostaram no seu estudo (Zuk, 2010; James *et al*, 2012).

O sucesso dos trabalhos *in vitro* já realizados a partir de ADSCs na criação de novo osso, tem incentivado investigadores para a sua aplicação *in vivo* (Mizuno, 2009). A possibilidade de isolamento de ADSCs e a sua capacidade de diferenciação em osteoblastos já foi demonstrada usando uma variedade de modelos pioneiros animais como o rato, o porco, o coelho e o cão (Li *et al*, 2007; Neupane *et al*, 2008; Arrigoni *et al*, 2009). Adicionalmente ADSCs isoladas a partir de humanos foram utilizadas com sucesso no tratamento de defeitos ósseos em pequenos e grandes animais (Cui *et al*,

2007; Elabd *et al*, 2007; Levi *et al*, 2010). Bons resultados *in vivo* têm sido obtidos quando a estas células são adicionadas fatores osteoindutores específicos e matrizes adequadas (Elabd *et al*, 2007; Leong *et al*, 2008; Mizuno, 2009). A título de exemplo Keibl e colaboradores, concluíram que ADSC combinadas com BMP-2 e embebidas numa matriz de fibrina podem representar um promissor e interessante modelo na regeneração óssea de pequenos defeitos ósseos (Keibl *et al*, 2011).

No primeiro caso clínico publicado, foram usadas, para o tratamento de defeitos ósseos craniais pós-traumáticos numa menina de sete anos, ADSCs autógenas numa matriz fibrina, combinadas com osso autógeno da crista ilíaca. Nesta primeira abordagem foram escolhidas ADSCs para aumentar a quantidade limitada de osso de enxerto disponível. Este osso autógeno teve também uma função de matriz osteocondutora e de fornecimento de fatores de crescimento para o estímulo das ADSCs. A tomografia computadorizada pós-cirúrgica revelou a formação de novo osso com a correção quase completa do defeito (Lendeckel *et al*, 2004).

Recentemente Mesimaki e colaboradores expuseram o primeiro caso de um enxerto de osso ectópico microvascularizado desenvolvido a partir de ADSCs autógenas e reimplantado num paciente após hemimaxilectomia (Mesimäki *et al*, 2009).

Os resultados destas e de muitas outras pesquisas feitas ao longo dos últimos anos fazem-nos facilmente acreditar na enorme potencialidade da aplicação de células estaminais derivadas do tecido adiposo na reparação e regeneração do tecido ósseo (Arrigoni *et al*, 2009; James *et al*, 2012). Não obstante, alguns autores têm revelado que estas células sem a estimulação por BMP-2 podem falhar no tratamento de grandes defeitos ósseos, que tenham resultado por exemplo de traumas severos ou de grandes ressecções tumorais (Im *et al*, 2005; Li *et al*, 2007). Para além disso, o tempo necessário para induzir a diferenciação nestas células, para que possam ser implantadas, é muito prolongado (Prè *et al*, 2011). Assim, um dos problemas que tem sido levantado é a possível pouca utilidade das ADSCs em grandes regenerações. Como referido ao longo desta revisão, estratégias têm sido desenvolvidas neste sentido. Entre as quais, o recurso a técnicas de prolongamento da expressão de genes indutores ósseos através de modelo virais ou da transfecção de fatores de transcrição específicos por eletroporação, o uso de ultrassons, e o tratamento das células com vibração de alta frequência (Li *et al*, 2007; Lee *et al*, 2011; Lin *et al*, 2011; Prè *et al*, 2011; Jiang *et al*, 2012). Persiste, no entanto, a necessidade de estudos que explorem e descrevam de forma mais detalhada os eventos celulares e moleculares envolvidos na diferenciação osteoblástica. Uma melhor



compreensão de tais mecanismos conduziria, possivelmente, a uma otimização da terapia por ADSCs.

Ao longo das últimas décadas, a medula óssea têm sido uma das fontes de células estaminais adultas mais usadas na Medicina Regenerativa (Shoji *et al*, 2010; Monaco *et al*, 2011). Comparativamente com as células desta fonte, as principais vantagens das ADSCs estão relacionadas com a grande abundância de tecido adiposo no organismo e com os procedimentos de colheita minimamente invasivos destas células (Schaffler *et al*, 2007; Al-Salleeh *et al*, 2008; Lee *et al*, 2008; Prè *et al*, 2011). Para além disso, investigadores indicam que numa mesma amostra de tecido é possível a obtenção de uma maior quantidade de células mesenquimatosas indiferenciadas no tecido adiposo do que na medula óssea (Xu *et al*, 2007; James *et al*, 2012). Segundo Monaco e colaboradores o cenário ideal na terapia celular seria a colheita das células estaminais do paciente e a sua implantação durante uma cirurgia única. Desta forma, a cultura e o crescimento *in vitro* das células estaminais seriam omitidos, implicando a necessidade da colheita de uma grande quantidade de células. Nesta situação o tecido adiposo representaria um melhor candidato como fonte de células comparativamente à medula óssea, pela sua maior riqueza nestas células (Monaco *et al*, 2011). Relativamente ao potencial osteogénico das células de ambas as fontes é referido na literatura que as ADSC podem ter uma maior apetência para a formação de osso esponjoso enquanto BMDSC para o osso compacto (Monaco *et al*, 2009). Outra diferença a destacar entre as ADSCs e as BMDSC é o efeito estimulatório da diferenciação osteogénica que a dexametasona exerce nas BMDSCs, e o possível efeito inibitório referido em alguns estudos nas ADSCs (Zuk *et al*, 2002; Al-Salleeh *et al*, 2008). Continua a existir uma carência em estudos *in vivo* que façam uma comparação direta entre as células estaminais derivadas da medula óssea e do tecido adiposo na reconstrução óssea. Contudo as células mesenquimatosas do tecido adiposo parecem ser mais promissoras nesta área (Keibl *et al*, 2011; Monaco *et al*, 2011).

Embora ainda controverso, fatores como a idade do dador, o local de colheita (subcutâneo ou visceral) e o tipo de procedimento cirúrgico usado para obtenção do tecido, a composição, as condições e o tempo da cultura, podem ter alguma influência tanto nas taxas de proliferação como nas taxas de diferenciação das ADSCs (Schaffler *et al*, 2007; Schipper *et al*, 2008; Wahl *et al*, 2008; Cheng *et al*, 2011; Prè *et al*, 2011).

No início deste ano, uma investigação publicada na revista “Stem Cells Translational Medicine”, demonstra que a fração do estroma vascular (SVF) do tecido

adiposo, de onde são obtidas as células estaminais, pode ser processada de forma a que sejam isoladas as denominadas células do estroma perivascular (PSCs). Estas, pelo seu maior grau de pureza, constituindo uma população de células estaminais mesenquimatosas não contendo células estaminais hematopoiéticas, endoteliais, ou células não viáveis, podem ser mais eficazes na formação de osso (James *et al*, 2012).

## **IX - Conclusão**

A magnificência das recentes descobertas relativamente às células estaminais do tecido adiposo poderá permitir que, num futuro próximo, estas possam ser aplicadas na prática clínica como uma terapia na reparação de defeitos ósseos. A viabilidade comprovada de uma fonte de células, relativamente fáceis de obter e com o mínimo de complicações, na substituição do osso humano será com certeza benéfico (Mizuno, 2009; Cheng *et al*, 2011). Porém, antes que tal venha a acontecer, muitas questões têm que ser esclarecidas. Será que diferentes regiões anatómicas ou diferentes procedimentos de colheita de tecido adiposo poderão afetar a quantidade e qualidade das ADSCs? Quais os fatores que conduzem ao comprometimento destas células a uma determinada linhagem celular? Que vias de sinalização estão realmente envolvidas na diferenciação osteoblástica? Como controlar e melhorar os processos de proliferação e diferenciação? Será que pode haver uma transformação maligna destas células? E quando? (Elabd *et al*, 2007; Schaffler *et al*, 2007; Cheng *et al*, 2011)

Seria de grande relevância que estratégias futuras se centrassem na pesquisa de fatores osteoindutores alternativos para as ADSCs; na otimização das matrizes, dos procedimentos de isolamento das células e da cultura *in vitro*; no estudo aprofundado dos mecanismos de diferenciação e proliferação destas células e em métodos que monitorizem e assegurem a qualidade destas células (Cheng *et al*, 2011; Lequeux *et al*, 2011; Prè *et al*, 2011).

## **X - Bibliografia**

- 1** - Ahlmann E, Patzakis M, Roidis N, Shepherd L, Holtom P. Comparison of anterior and posterior iliac crest bone graft in terms of harvest-site morbidity and functional outcomes. *The Journal of Bone & Joint Surgery*. 2002; 84(5):716–720.
- 2** - Albright A, Stern J. Adipose tissue. *Encyclopedia of sports medicine and science*. Internet Society for Sport Science. 1998.
- 3** - Al-Salleh F, Beatty MW, Reinhardt RA, Petro TM, Crouch L. Human Osteogenic protein-1 induces osteogenic differentiation of adipose-derived stem cells harvested from mice. *Archives of Oral Biology*. 2008; (53) 928-936.
- 4** - Anurag G, Tai LD, Fen BH, Brat SS, Chye-Thiam L, Werner HD. Osteo-maturation of adipose-derived stem cells required the combined action of vitamin D3, beta-glycerophosphate, and ascorbic acid. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2007; (362) 17-24.
- 5** - Armstrong L, Lako M, Buckley N, Lappin TRJ, Murphy MJ, Nolta JA, Pittenger M, Stojkovic M. Editorial: Our Top 10 Developments in Stem Cell Biology over the Last 30 Years. *Stem Cells*. 2012; 30:2–9.
- 6** - Arrigoni E, Lopa S, Girolamo L, Stanco D, Brini AT. Isolation, characterization and osteogenic differentiation of adipose-derived stem cells: from small to large animal models. *Cell Tissue Res*. 2009; 338:401-411.
- 7** - Autefage H, Briand-Me'sange F, Cazalbou S, Drouet C, Fourmy D, Gonc , Alve's S, Salles JP, Combes C, Swider P, Rey C. Adsorption and release of BMP-2 on nanocrystalline apatite-coated and uncoated hydroxyapatite/ b -tricalcium phosphate porous ceramics. *J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater*. 2009; 91B(2):706–715.
- 8** - Baglioni S, Francalanci M, Squecco R, Lombardi A, Cantini G, Angeli R, Gelmini S, Guasti D, Benvenuti S, Annunziato F, Bani D, Liotta F, Francini F, Perigli G, Serio

M, Luconi M. Characterization of human adult stem-cell populations isolated from visceral and subcutaneous adipose tissue. *FASEB J.* 2009;23:3494–505.

**9** - Bishop AE, Buttery LD, Polak JM. Embryonic stem cells. *J Pathol.* 2002;197(4):424–429.

**10** - Blanton MW, Hadad I, Johnstone BH, Mund JA, Rogers PI, Eppley BL et al. Adipose stromal cells and platelet-rich plasma therapies synergistically increase revascularization during wound healing. *Plast Reconstr Surg.* 2009; 123(2 Suppl):56S–64S.

**11** - Boyce ST, Ham, RG. Calcium-Regulated Differentiation of Normal Human Epidermal Keratinocytes in Chemically Defined Clonal Culture and Serum-Free Serial Culture. *J. Invest. Dermatol.* 1983; 81, 33-40.

**12** - Bragança J, Tavares A, Belo JA. Células estaminais e medicina regenerativa: Um admirável mundo novo. *Revista Sociedade Portuguesa de Bioquímica.* 2010; 7: 4-17.

**13** - Bragdon B, Moseychuk O, Saldanha S, King D, Julian J, Nohe A. Bone Morphogenetic Proteins: A critical review. *Cellular Signalling.* 2011; (23) 609-620.

**14** - Brevi BC, Magri AS, Toma L, Sesenna E. Cranioplasty for repair of a large bone defect with autologous and homologous bone in children. *J Pediatric Surgery.* 2010;45:E17–E20.

**15** - Cao Y, Sun Z, Liao L, Meng Y, Han Q, Zhao RC. Human adipose tissue-derived stem cells differentiate into endothelial cells in vitro and improve postnatal neovascularization in vivo. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005; 332(2):370–379.

**16** - Caplan AI, Bruder S. Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21<sup>st</sup> century. (Review) *Trends in Molecular Medicine.* 2001; (Vol.7 No.6).

- 17** - Casteilla L, Dani C. Adipose tissue-derived cells: From Physiology to regenerative medicine. Review. Diabetes Metab. 2006; 32: 393-401.
- 18** - Celil AB, Hollinger JO, Campbell PG. Osx transcriptional regulation is mediated by additional pathways to BMP2/Smad signaling. J Cell Biochem. 2005; 95(3):518–528.
- 19** - Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Concise Review: Mesenchymal Stem Cells: Their Phenotype, Differentiation Capacity, Immunological Features, and Potential for Homing. Stem Cells. 2007;25:2739–2749.
- 20** - Cheng K-H, Kuo T-L, Kuo K-K, Hsiao C-C. Human adipose-derived stem cells: Isolation, characterization and current application in regeneration medicine. Genomic Medicine, Biomarkers, and Health Sciences. 2011; 3, 53-62.
- 21** - Cirna-Lima EO. Stem Cells. Rev HCPA. 2007; 27 (3):66-73
- 22** - Cowan CM, Shi YY, Aalami OO, Chou YF, Mari C, Thomas R, Quarto N, Contag CH, Wu B, Longaker MT. Adipose-derived adult stromal cells heal critical-size mouse calvarial defects. Natural Biotechnology. 2004; Volume 22- Number 5).
- 23** - Cui L, Liu B, Liu G, Zhang W, Cen L, Sun J, Yin S, Liu W, Cao Y. Repair of cranial bone defects with adipose derived stem cells and coral scaffold in a canine model. Biomaterials. 2007; 28 5477–5486.
- 24** - Davis HE, Case EM, Miller SL, Genetos DC, Leach JK. Osteogenic Response to BMP-2 of hMSCs Grown on Apatite-Coated Scaffolds. Biotechnology and Bioengineering. 2011.
- 25** - DelaRosa O, Lombardo E. Modulation of adult mesenchymal stem cells activity by toll-like receptors: implications on therapeutic potential. Mediators of Inflammation. 2010; 2010:865601.
- 26** - De Ugarte DA, Alfonso Z, Zuk PA et al. Differential expression of stem cell mobilization-associated molecules on multi-lineage cells from adipose tissue and bone marrow. Immunol Lett. 2003;89:267–270.

- 27** - Dicker A, Le Blanc K, Astrom G et al. Functional studies of mesenchymal stem cells derived from adult human adipose tissue. *Exp Cell Res*. 2005;308:283–290.
- 28** - Dimitriou R, Mataliotakis GI, Angoules AG, Kanakaris NK, Giannoudis PV. Complications following autologous bone graft harvesting from the iliac crest and using three RIA: A systematic review. *Injury*. 2011; (volume 42, supplement 2) Pages S3-S15.
- 29** - Dominici M, Le Blanc K, Mueller I et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8:315–317.
- 30** - Dragoo JL, Choi JY, Lieberman JR, Huang J, Zuk PA, Zhang J, Hedrick MH, Benhaim P. Bone induction by BMP-2 transduced stem cells derived from human fat. *Journal of Orthopaedic Research*. 2003; (21) 622-629.
- 31** - Egusa H, Sonoyama W, Nishimura M, Atsuta I, Akiyama K. Stem cells in dentistry – Part I: Stem cell sources. (Review). *Journal of Prosthodontic Research*. 2012; (56) 151-165.
- 32** - Elabd C, Chiellini C, Massoudi A, Cochet O, Zaragosi L-E, Trojani C, Michiels J-F, Weiss P, Carle G, Rochet N, Dechesne C.A, Ailhaud G, Dani C, Amri Ez-Z. Human adipose tissue-derived multipotent stem cells differentiate in vitro and in vivo into osteocyte-like cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2007; (361) 342-348.
- 33** - Esposito M, Grusovin MG, Coulthard P, Worthington HV. Enamel matrix derivative (Emdogain) for periodontal tissue regeneration in intrabony defects. *The Cochrane Library*. 2005, Issue 3
- 34** - Fraser JK, Wulur I, Alfonso Z, Hedrick MH. Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends in Biotechnology*. 2006; ( Vol.24 No.4).

- 35** - Ghannam S, Bouffi C, Djouad F, Jorgensen C, Noel D. Immunosuppression by mesenchymal stem cells: mechanisms and clinical applications. *Stem Cell Res Ther.* 2010;1:2.
- 36** - Girolamo L, Sartori MF, Albisetti W, Brini AT. Osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells: comparison of two different inductive media. *J Tissue Eng Regen Med.* 2007; (1) 154-157.
- 37** - Gomillion CT, Burg KJL. Stem cells and adipose tissue engineering. *Biomaterials.* 2006; (27) 6052-6063.
- 38** - Gu H, Guo F, Zhou X, Gong L, Zhang Y, Zhai W, Chen L, Cen L, Yin S, Chang J, Cui L. The stimulation of osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells by ionic products from akermanite dissolution via activation of the ERK pathway. *Biomaterials.* 2011; (32) 7023e7033.
- 39** - Hammarström L. Enamel matrix, cementum development and regeneration. *Journal of Clinical Periodontology.* 1997; Vol 24, Issue 9, pages 658–668.
- 40** - Heldin CH, Miyazono K, Dijke P. TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature.* 1997; 390, 465 – 471.
- 41** - Horwitz EM, Gordon PL, Koo WK, Marx JC, Neel MD, McNall RY, Muul L, Hofmann T. Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002; 99:8932-8937.
- 42** - Huang GTJ, Gronthos S, Shi S. Mesenchymal Stem Cells Derived From Dental Tissues vs. Those From Other Sources: Their Biology and Role in Regenerative Medicine. *J Dent Res.* 2009; 88(9):792-806.
- 43** - Hong JH, Yaffe MB. TAZ: A beta-catenin-like molecule that regulates mesenchymal stem cell differentiation. *Cell Cycle.* 2006; 5:176–179.

- 44** - Hupp JR, Ellis III E, Tucker MR. Cirurgia Oral e Maxilofacial Contemporânea. Elsevier Editora Ltda. 2009, 5ª Edição.
- 45** - Ikebukuro-K, Ku-T. TGF-Beta signaling by Smad Proteins. (Kohei Miyazono). Cytokine & Growth Factor Reviews. 2000; 11: 15-22.
- 46** - Im GI, Shin YW, Lee KB. Do adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have the same osteogenic and chondrogenic potential as bone marrow-derived cells? Osteoarthritis Cartilage. 2005; 13:845e53.
- 47** - James AW, Zara JN, Zhang X, Askarinam A, Goyal R, Chiang M, Yuan W, Chang L, Corselli M, Shen J, Shen P, Stoker D, Wu B, Ting K, Péault, Soo C. Perivascular Stem Cells: A Prospectively Purified Mesenchymal Stem Cell Population for Bone Tissue Engineering. Stem Cells Translational Medicine. 2012;1:510–519
- 48** - Jiang T, Xu T, Guo F, Chen A, Xiao Z, Zhang D. Osteogenic Effect of Low Intensity Pulsed Ultrasound on Rat Adipose-derived Stem Cells in vitro. J Huazhong Univ Sci Technol [Med Sci]. 2012; 32(1):75-81
- 49** - Junttila MR, Li SP, Westermarck J. Phosphatase-mediated crosstalk between MAPK signaling pathways in the regulation of cell survival. FASEB J. 2008; 22:954e65.
- 50** - Kaji EH, Leiden JM. Gene and stem cell therapies. JAMA. 2001;285(5):545–550.
- 51** - Kang SW, Yang HS, Seo SW, Han DK, Kim B-S. Apatite-coated poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres as an injectable scaffold for bone tissue engineering. J Biomed Mater Res Part A. 2008; 85A(3):747–756.
- 52** - Keibl C, Fugl A, Zanoni G, Tangl S, Wolbank S, Redl H, Griensven M. Van. Human adipose derived stem cells reduce callus volume upon BMP-2 administration in bone regeneration. Injury. Int. J. Care Injured. 2011; (42) 814-820.
- 53** - Kern S, Eichler H, Stoeve J, Kluter H, Bieback K, Comparative Analysis of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Umbilical Cord Blood, or Adipose Tissue. Stem Cells. 2006;24:1294–1301.



- 54** - Kim Y, Kim H, Cho H, Bae Y, Suh K, Jung J. Direct comparison of human mesenchymal stem cells derived from adipose tissues and bone marrow in mediating neovascularization in response to vascular ischemia. *Cell Physiol Biochem.* 2007; 20(6):867–876.
- 55** - Komori T. Regulation of osteoblast differentiation by transcription factors. *J Cell Biochem.* 2006; 99(5):1233e9.
- 56** - Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science.* 1993; 260(5110):920-6.
- 57** - Lanza RP, Langer RS, Vacanti J. Principles of tissue engineering. 2nd ed. San Diego, CA: Academic Press. 2000.
- 58** - Le Blanc K, Tammik C, Rosendahl K, Zetterberg E, Ringden O. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Exp Hematol.* 2003; 31:890–6.
- 59** - Lee HS, Cho HH, Kim HK et al. Tbx3, a transcriptional factor, involves in proliferation and osteogenic differentiation of human adipose stromal cells. *Mol Cell Biochem.* 2006; in press.
- 60** - Lee JH, Rhie JW, Oh DY, Ahn ST. Osteogenic differentiation of human adipose tissue-derived stromal cells (hASCs) in a porous three-dimensional scaffold. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2008; (370) 456-460.
- 61** - Lee JS, Lee JM, Im G-II. Electroporation-mediated transfer of Runx2 and osterix genes to enhance osteogenesis of adipose stem cells. *Biomaterials.* 2011; (32) 760-768.
- 62** - Lendeckel S, Jodicke A, Christophis P, Heidinger K, Wolff J, Fraser JK, Hedrick MH, Berthold L, Howaldt HP. Autologous stem cells (adipose) and fibrin glue used to treat widespread traumatic calvarial defects: case report. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery.* 2004; (32) 370-373.
- 63** - Leong DT, Nah WK, Gupta A, Hutmacher DW, Woodruff MA. The osteogenic differentiation of adipose tissue-derived precursor cells in a 3D scaffold/matrix environment. *Current Drug Discovery Technologies.* 2008; 5(4). pp. 319-327.

- 64** - Lequeux C, Oni G, Mojallal A, Damour O, Brown SA. Adipose derived stem cells: efficiency, toxicity, stability of BrdU labeling and effects on self-renewal and adipose differentiation. *Mol Cell Biochem.* 2011; 351:65–75.
- 65** - Levi B, James AW, Nelson ER, Vistnes D, Wu B, Lee M, Gupta A, Longaker MT. Human Adipose Derived Stromal Cells Heal Critical Size Mouse Calvarial Defects. *PLoS.* 2010; Vol.5 I.3
- 66** - Lian JB, Javed A, Zaidi SK et al. Regulatory controls for osteoblast growth and differentiation: Role of Runx/Cbfa/AML factors. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2004; 14:1–41.
- 67** - Li H, Dai K, Tang T, Zhang X, Yan M, Lou J. Bone regeneration by implantation of adipose-derived stromal cells expressing BMP-2. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2007; (356) 836-842.
- 68** - Lin CY, Lin KJ, Kao Cy, Chen MC, Lo WH, Yen TC, Chang YH, Hu Yc. The role of adipose-derived stem cells engineered with the persistently expressing hybrid baculovirus in the healing of massive bone defects. *Biomaterials.* 2011; (32) 6505-6514.
- 69** - Lindsay DT. *Functional human anatomy.* St. Louis: Mosby; 1996.
- 70** - Liu Q, Cen L, Zhou H, Yin S, Liu G, Liu W, et al. The role of the extracellular signal-related kinase signaling pathway in osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells and in adipogenic transition initiated by dexamethasone. *Tissue Eng Part A.* 2009; 15:3487e97.
- 71** - Liu TM, Martina M, Hutmacher DW, Hui JHP, Lee H. Eng, Lim B. Identification of Common Pathways Mediation Differentiation of Bone Marrow- and Adipose Tissue-Derived Human Mesenchymal Stem Cells into Three Mesenchymal Lineages. *Stem Cells.* 2007;25:750–760
- 72** - Li X, Liu H, Niu X, Yu B, Fan Y, Feng Q, Cui F-Z, Watari F. The use of carbon nanotubes to induce osteogenic differentiation of human adipose-derived MSCs in vitro and ectopic bone formation in vivo. *Biomaterials.* 2012; (33) 4818-4827.

- 73** - Lu F, Mizuno H, Uysal CA, Cai X, Ogawa R, Hyakusoku H. Improved viability of random pattern skin flaps through the use of adipose-derived stem cells. *Plast Reconstr Surg.* 2008; 121(1):50–58.
- 74** - Malafaya PP, Pedro AJ, Peterbauer A et al. Chitosan particles agglomerated scaffolds for cartilage and osteochondral tissue engineering approaches with adipose tissue derived stem cells. *J Mater Sci Mater Med.* 2005; 16:1077–1085.
- 75** - Mao JJ, Giannobile WV, Helms JA, Hollister SJ, Krebsbach PH, Longaker MT, Shi S. Craniofacial Tissue Engineering by Stem Cells. *J Dent Res.* 2006; 85(11): 966–979.
- 76** - Mehta M, Strube P, Peters A, Perka C, Hutmacher C, Fratzl P, Duda GN. Influences of age and mechanical stability on volume, microstructure, and mineralization of the fracture callus during bone healing: Is osteoclast activity the key to age-related impaired healing? *Bone* 47. 2010: 219-228.
- 77** - Meirelles LS, Fontes AM, Covas DT, Caplan AI. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2009; 20:419–427.
- 78** - Mesimäki K, Lindroos J, Tornwall JM, Lindqvist C, Kontio R, Miettinen S, Suuronen R. Novel maxillary reconstruction with ectopic bone formation by GMP adipose stem cells. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 2009; (38) 201-209.
- 79** - Mizuno H. Adipose-derived stem cells for tissue repair and regeneration: ten years of research and a literature review. *J Nippon Med Sch.* 2009;76:56–66.
- 80** - Mojallal A, Lequeux C, Shipkov C, Duclos A, Braye F, Rohrich R, Brown S, Damour O. Influence of Age and Body Mass Index on the Yield and Proliferation Capacity of Adipose-Derived Stem Cells. *Aesth Plast Surg.* 2011; (35) 1097-1105.
- 81** - Monaco E, Bionaz M, Hollister S.J, Wheeler MB. Biology and Therapeutic Use of Domestic Animal Stem Cells- Strategies for regeneration of the bone using porcine adult adipose-derived mesenchymal stem cells. *Theriogenology.* 2011; (75) 1381-1399.

- 82** - Monaco E, Lima A, Bionaz M, Makia A, Hurley WL, Wheeler MB. Morphological and Transcriptomic Comparison of Adipose and Bone Marrow Derived Porcine Stem Cells. *J Tissue Eng Regen Med.* 2009; 2:20–33.
- 83** - Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, de Crombrughe B. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell.* 2002; 108(1):17–29.
- 84** - Nambu M, Ishihara M, Nakamura S, Mizuno H, Yanagibayashi S, Kanatani Y et al. Enhanced healing of mitomycin C-treated wounds in rats using inbred adipose tissue-derived stromal cells within an atelocollagen matrix. *Wound Repair Regen.* 2007; 15(4):505–510.
- 85** - Neupane M, Chang C-C, Kiupel M, Gurkan VY, Isolation and Characterization of Canine Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Tissue Engineering: Part A.* 2008; (Vol. 14, Number 6).
- 86** - Okuda T, Uysal AC, Tobita M, Hyakusoku H, Mizuno H. Prefabrication of Tissue Engineered Bone Grafts. An Experimental Study. *Ann Plast Surg.* 2010;64: 98–104.
- 87** - Oku H, Kumamoto C, Miyagi T, Hiyane T, Nagata J, Chinen I. Serum-free culture of rat keratinocytes. *La Vitro Cell. Dev.Biol.* 1994; (30A) 496-503.
- 88** - Otto F, Thornell AP, Crompton T, et al. *Cbfa1*, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell.* 1997; 89(5):765-771.
- 89** - Padoin AV, Braga-Silva J, Martins P, Rezende K, Rezende AR, Grechi B, Gehlen D, Machado DC. Sources of processed lipoaspirate cells: influence of donor site on cell concentration. *Plast Reconstr Surg.* 2008; 122:614–618.
- 90** - Peptan IA, Hong L, Mao JJ. Comparison of osteogenic potentials of visceral and subcutaneous adipose-derived cells of rabbits. *Plast Reconstr Surg.* 2006;117:1462–1470.

- 91** - Perry D. Patients' voices: the powerful sound in the stem cell debate. *Science*. 2000; 287(5457):1423.
- 92** - Pieri F, Lucarelli E, Corinaldesi G, Aldini NN, Fini M, Parrilli A, Dozza B, Donati D, Marchetti C. Dose-dependent effect of adipose-derived adult stem cells on vertical bone regeneration in rabbit calvarium. *Biomaterials*. 2010; (31) 3527-3535.
- 93** - Porter JR, Ruckh TT, Popat KC. Bone tissue engineering: a review in bone biomimetics and drug delivery strategies. *Biotechnol Prog*. 2009; 25:1539e60.
- 94** - Prè D, Ceccarelli G, Gastaldi G, Asti A, Saino E, Visai L, Benazzo F, Angelis M.G. C De, Magenes G. The differentiation of human adipose-derived stem cells (hASCs) into osteoblasts is promoted by low amplitude, high frequency vibration treatment. *Bone*. 2011; (49) 295-303.
- 95** - Puissant B, Barreau C, Bourin P et al. Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: Comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *Br J Haematol*. 2005; 129:118–129.
- 96** - Rodbell M. Metabolism of Isolated Fat cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 1964; Vol. 239, No. 2.
- 97** - Rodriguez AM, Elabd C, Amri Ez-Z, Ailhaud G, Dani C. The human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Biochimie*. 2005; (87) 125-128.
- 98** - Rodriguez AM, Elabd C, Delteil F, Astier J, Vernochet C, Saint-Marc P, Guesnet J, Guezennec A, Amri E-Z, Dani C, Ailhaud G. Adipocyte differentiation of multipotent cells established from human adipose tissue. *Biochemical and biophysical Research Communication*. 2004; (315) 255-263.
- 99** - Rubio D, Garcia-Castro J, Martin MC, et al. Spontaneous human adult stem cell transformation. *Cancer Res*. 2005; 65: 3035—3039.
- 100** - Ryoo H-M, Lee M-H, Kim Y-J. Critical molecular switches involved in BMP-2-induced osteogenic differentiation of mesenchymal cells. *Gene*. 2006; (366) 51-57.

- 101** - Schaffler A, Buchler C. Concise Review: Adipose Tissue-Derived Stromal cells--- Basic and Clinical Implications for Novel Cell-Based Therapies. *Stem Cells*. 2007; (25) 818-827.
- 102** - Schipper BM, Marra KG, Zhang W, et al. Regional anatomic and age effects on cell function of human adipose-derived stem cells. *Ann Plast Surg*. 2008;60:538 e 44.
- 103** - Shi Yigong, Massague J. Mechanisms of TGF-beta Signaling from Cell Membrane to the Nucleus. *Cell*. 2003; (vol. 113) 685-700.
- 104** - Shoji T, Ii M, Mifune Y, Matsumoto T, Kawamoto A, Kwon SM, Kuroda T, Kuroda R, Kurosaka M, Asahara T. Local transplantation of human multipotent adipose-derived stem cells accelerates fracture healing via enhanced osteogenesis and angiogenesis. *Lab Invest*. 2010;90:637–49.
- 105** - Simsek SB, Keles GC, Baris S, Cetinkaya BO. Comparison of mesenchymal stem cells and autogenous cortical bone graft in the treatment of class II furcation defects in dogs. *Clin Oral Invest*. 2012; 16:251 – 258.
- 106** - Slynarski K, Deszczynski J, Karpinski J. Fresh bone marrow and periosteum transplantation for cartilage defects of the knee. *Transplantation Proceedings*. 2006; 38:318–319.
- 107** - Soucacos PN, Johnson EO, Babis G. An update on recent advances in bone regeneration. *Injury, Int. J. Care Injured*. 2008; 39S2, S1–S4.
- 108** - Sterodimas A, Faria J, Nicaretta B, Pitanguy I. Tissue engineering with adipose-derived stem cells (ADSCs): Current and future applications. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery*. 2010; (63) 1886-1892.
- 109** - Suga H, Eto H, Shigeura T, et al. Yoshimura K. IFATS Series: FGF-2-induced HGF Secretion By Adipose-Derived Stromal Cells Inhibits Post-Injury Fibrogenesis Through A JNK-Dependent Mechanism. *Stem Cells*. 2008.

- 110** - Tang W, Li Y, Osimiri L, Zhang C. Osteoblast-specific Transcription Factor Osterix (Osx) Is an Upstream Regulator of Satb2 during Bone Formation. *Journal of Biological Chemistry*. 2011; (Vol. 286, N. 38).
- 111** - Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro S, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. *Science*. 1998; Vol. 282 Issue 5391, p1145.
- 112** - Thomson JA, Kalishman J, Golos TG et al. Isolation of a primate embryonic stem cell line. *Proc Natl Acad Sci*. 1995;92:7844–7848.
- 113** - Tsagias N, Koliakos KK, Koliakos I, Kostidou E, Karagiannis V, Daniilidis A, Koliakos G. Addition of Adipose-Derived Stem Cells in Cord Blood Cultures Stimulates Their Pluripotent Differentiation. *Transplantation Proceedings*. 2009; (41) 4340-4344.
- 114** - Turksen K, Totowa NJ. Adult stem cells. Humana Press. 2004.
- 115** - Urist MR. Bone: formation by autoinduction. *Science*. 1965; 150, 893 – 899.
- 116** - Urist MR, Strates BS. Bone morphogenetic protein. *J. Dent. Res*. 1971; 50,1392 – 1406.
- 117** - Vacanti JP, Langer R. Tissue engineering: the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation. *The Lancet*. 1999; 354 Suppl 1:SI32–SI34.
- 118** - Van RL, Roncari DA. Isolation of fat cell precursors from adult rat adipose tissue. *Cell Tissue Res*. 1977;181:197 e 203.
- 119** - Vats A, Tolley NS, Polak JM, Buttery LD. Stem cells: sources and applications. *Clin Otolaryngol Allied Sci*. 2002; 27(4):227–232.

- 120** - Wahl P, Brixius K, Bloch W. Exercise-induced stem cell activation and its implication for cardiovascular and skeletal muscle regeneration. *Minim Invasive Ther Allied Technol.* 2008;17:91–9.
- 121** - Wang EA, et al. Purification and characterization of other distinct bone inducing factors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1988; 85, 9484 – 9488.
- 122** - Wang HL, Cooke J. Periodontal regeneration techniques for treatment of periodontal diseases. *Dent Clin N Am.* 2005; 49:637-659
- 123** - Weinzierl K, Hemprich A, Frerich B. Bone engineering with adipose tissue derived stromal cells. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery.* 2006; 34, 466- 471.
- 124** - Weisberg SP, McCann D, Desai M et al. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest.* 2003;112:1796–1808.
- 125** - Wilson SM, Goldwasser MS, Clark SG, Monaco E, Bionaz M, Hurley WL, Rodriguez-Zas S, Feng L, Dymon Z, Wheeler MB. Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Enhance Healing of Mandibular Defects in the Ramus of Swine. *J Oral Maxillofac Surg.* 2012; 70:e193-e203.
- 126** - Xu H, Barnes GT, Yang Q et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest.* 2003;112:1821–1830.
- 127** - Xu Y, Balooch G, Chiou M, Bekerman E, Ritchie RO, Longaker MT. Analysis of the material properties of early chondrogenic differentiated adipose-derived stromal cells (ASC) using an in vitro three-dimensional micromass culture system, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007; 359 311–316.
- 128** - Zaragosi LE, Ailhaud G, Dani C. Autocrine Fibroblast Growth Factor 2 Signaling Is Critical for Self-Renewal of Human Multipotent Adipose-Derived Stem Cells. *Stem Cells.* 2006;24:2412–2419.



**129** - Zhang Y, Bellows C, Simmons P, Khalsa A, Kolonin M. Circulation of progenitor and endothelial cells in obese patients: the contribution of adipose tissue. ISSCR 8th Annual Meeting, San Francisco. 2010;K16.

**130** - Zuk PA. The Adipose-derived Stem Cell: Looking Back and Looking Ahead. *Molecular Biology of the Cell*. 2010; Vol. 21, 1783–1787.

**131** - Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De-Ugarte DA, Huang JJ, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH. Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells. *Molecular Biology of the cell*. 2002; (vol. 13) 4279-4295.

**132** - <http://stemcellgurus.com/2012/05/08/msc1/>